

博 士 論 文

四糖ヒアルロン酸オリゴ糖の 皮膚における機能解析

平成 24 年度 3 月

城西大学 大学院 薬学研究科

鹿毛 まどか

目次

略語	1
緒言	3
第 1 章 HA4 の皮膚透過性と皮膚機能に及ぼす影響	
第 1 節 緒論	7
第 2 節 実験方法	9
2-1. 実験材料	9
2-2. 実験動物	9
2-3. 皮膚透過サンプルの調製	9
2-4. 皮膚透過膜の準備	9
2-5. <i>In vitro</i> 皮膚透過試験	10
2-6. HA4 の分析	10
2-7. ヒアルロン酸の定量	11
2-8. <i>In vivo</i> 実験	11
2-9. 皮膚機能の測定	12
2-10. 皮膚の組織学的観察	13
2-11. 表皮厚の計測	14
2-12. データ解析	14
第 3 節 結果	15
3-1. 全層皮膚および角層剥離皮膚を用いた HA4 の皮膚透過	15
3-2. pH 変化における HA4 の皮膚透過	18

3-3. 分子量の違いによるヒアルロン酸の皮膚透過量の比較	19
3-4. HA および HA4 塗布における角層水分量および TEWL、粘弾性の変化	20
3-5. HA および HA4 塗布における表皮厚の変化	25
第 4 節 考察	27
第 2 章 HA4 による線維芽細胞のヒアルロン酸生成に及ぼす影響	
第 1 節 緒論	32
第 2 節 実験方法	34
2-1. 実験材料	34
2-2. 使用細胞	34
2-3. 細胞培養	34
2-4. サンプル添加	35
2-5. MTT 試験による細胞毒性の評価	36
2-6. セルカウントによる細胞増殖の評価	36
2-7. RNA 抽出	36
2-8. Real time PCR	37
2-9. 細胞上清中ヒアルロン酸量の定量	38
2-10. <i>In vivo</i> における皮膚サンプルの作成	39
2-11. 皮膚内ヒアルロン酸の抽出	39
2-12. 皮膚内ヒアルロン酸量の定量	39
2-13. HABP 染色	40
2-14. データ解析	41
第 3 節 結果	42
3-1. 線維芽細胞における HA および HA4 の細胞毒性と細胞増殖への影響	42

3-2. 線維芽細胞における HA および HA4 添加による HAS 遺伝子 発現量とヒアルロン酸生成量の比較	43
3-3. 線維芽細胞・表皮細胞の共培養における HA および HA4 添加 による HAS 遺伝子発現量とヒアルロン酸生成量の比較	45
3-4. 線維芽細胞における L-HA 添加による HAS 遺伝子発現量と ヒアルロン酸生成量の変化	47
3-5. HA および HA4 塗布における皮膚内ヒアルロン酸量の変化	48
第 4 節 考察	49
第 3 章 HA4 による表皮細胞の分化に及ぼす影響	
第 1 節 緒論	53
第 2 節 実験方法	57
2-1. 実験材料	57
2-2. 使用細胞	57
2-3. 細胞培養	57
2-4. サンプル添加	57
2-5. MTT 試験による細胞毒性の評価	57
2-6. セルカウントによる細胞増殖の評価	57
2-7. RNA 抽出	58
2-8. Real time PCR	58
2-9. タンパク質抽出	59
2-10. ゲルの作成	59
2-11. 泳動サンプルの調製	59
2-12. Western blotting	60

2-13. 細胞内カルシウム濃度測定	61
2-14. データ解析	62
第3節 結果	63
3-1. 表皮細胞における HA および HA4 の細胞毒性と細胞増殖への影響	63
3-2. 表皮細胞における HA および HA4 添加による分化マーカー 遺伝子発現量の比較	64
3-3. 表皮細胞における HA および HA4 添加による分化マーカー タンパク質量の比較	67
3-4. 表皮細胞における HA および HA4 添加による CD44 遺伝子 発現量の比較	69
3-5. 表皮細胞における HA および HA4 添加による CD44 および リン酸化 CD44 タンパク質量の比較	70
3-6. 表皮細胞における HA および HA4 添加による細胞内カルシウム濃度の 変化	71
第4節 考察	72
結論	75
謝辞	79
参考文献	80

略語

ABC : avidin-biotin complex

APS : ammonium peroxodisulfate

BSA : bovine serum albumin

DAB : 3, 3'-diaminobenzidine

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

ELISA : enzyme linked immuno sorbent assay

FBS : fetal bovine serum

FITC : fluorescein isothiocyanate

GlcA : glucuronic acid

GlcNA : N-acetylglucosamine

HA : hyaluronan

HA4 : hyaluronan tetrasaccharide

HABP : hyaluronic acid binding protein

HAS : hyaluronan synthase

HE : hematoxylin-eosin

hEGF : human epidermal growth factor

HRP : horseradish peroxidase

K10 : keratin 10

K5 : keratin 5

L-HA : low molecular weight hyaluronan

MMP : matrix metalloproteinase

MTT : 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NF- κ B : nuclear factor-kappa B

NMF : natural moisturizing factor

O.C.T. : optimal cutting temperature

PET : polyethylene terephthalate

pCD44 : phosphor-CD44

PVDF : polyvinylidene difluoride

SC : stratum corneum

TEMED : tetramethylethylenediamine

TEWL : transepidermal water loss

TGase : transglutaminase

TLR4 : toll like receptor 4

緒言

皮膚は体表を覆う器官であるため、紫外線の影響を強く受ける。皮膚は個体の老化を如実に映し出す鏡であり、老化に対する防御や改善には機能のみならず美容改善が要求されることから、紫外線による光老化や生理学的な老化によるシワや弛みなどの改善にヒアルロン酸が頻繁に用いられている。化粧品としては、ヒアルロン酸は皮膚の乾燥を防ぎ潤いのある肌を保つ目的で配合されるなど、美容分野で幅広く用いられている。また、ヒアルロン酸は極めて高い保水能力や粘弾性を示すため、化粧品のみならず、変形性関節症や関節リウマチ、眼科領域などの治療において大変重要な役割を担っている。このように、ヒアルロン酸は様々な分野で応用されているが、まだ未解明なことは多い。したがって、ヒアルロン酸の機能を解明することは重要である。

ヒアルロン酸は、1934年にウシの眼の硝子体から発見され¹⁾、分子量が 10^7 Da にも及ぶ高分子多糖で、D-グルクロン酸 (glucuronic acid、GlcA) と *N*-アセチル-D-グルコサミン (*N*-acetylglucosamine、GlcNA) が交互に直鎖状に結合しているグリコサミノグリカンである (Fig. 1)²⁾。ヒアルロン酸は水を内包した生体内ゲルとして存在し、細胞空間・浸透圧の維持と共に、水、イオン、栄養素などの保持・移動、高分子成分の移動阻害などに関わることができる。さらに、生体内では恒常的にその合成が認められており、皮膚や関節などに高濃度に存在し、非共有結合により様々なタンパク質と相互作用して細胞移動や分化・増殖などの幅広い生理現象に関わっている。

ヒアルロン酸は、分子量 (糖鎖長) の違いによって様々な作用を示す。例えば、低分子ヒアルロン酸は炎症および細胞外基質破壊に関与するサイトカインやケモカインなどの誘導³⁻⁵⁾、血管新生の促進作用などがある⁶⁾。一方、高分子ヒア

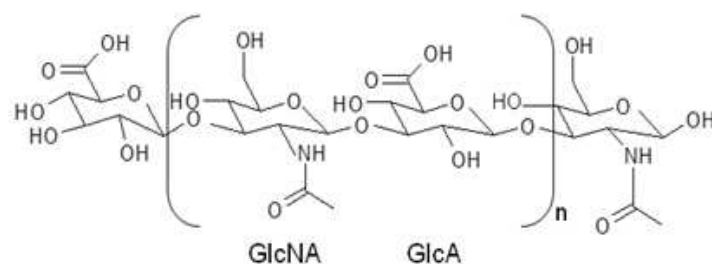


Fig. 1. Chemical structure of hyaluronan

ルロン酸は炎症性サイトカインおよびマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase、MMP) の産生、NF- κ B (nuclear factor-kappa B) 活性の抑制⁷⁻¹¹⁾、血管新生抑制作用¹²⁾などの作用を示す。ヒアルロン酸の研究は高分子量のものから始まり低分子量へと進み、昨今、ヒアルロン酸科学に携わる多くの研究者は、低分子ヒアルロン酸よりさらに糖鎖の短いヒアルロン酸オリゴ糖に関する生物学的・生化学的研究を行っている。この分野における最初の研究では、1974年に Hascall と Heinegard がアグリカンに結合する最小のヒアルロン酸は 10 糖であることを報告している¹³⁾。炎症や癌の組織においては、活性化されたヒアルロニダーゼにより低分子化されたヒアルロン酸がサイトカインなどを誘導し、炎症や細胞の浸潤・移動などを亢進する。これは高分子ヒアルロン酸では認められない作用であり、ヒアルロン酸は低分子化されると新たな機能や活性を獲得することを示している。この低分子ヒアルロン酸やヒアルロン酸オリゴ糖は、高分子ヒアルロン酸では認識できない特異的なタンパク質を認識する可能性が考えられている。現在、多くのヒアルロン酸結合タンパク質や受容体が見つかっており、様々な報告がある¹⁴⁻¹⁶⁾。また、ヒアルロン酸オリゴ糖は、内因性ヒアルロン酸のヒアルロン酸結合タンパク質への結合を阻害すること^{17,18)}からも、研究上で、ヒアルロン酸の分子量 (糖鎖長) およびヒア

ルロン酸の結合タンパク質や受容体の役割が重要なツールとなると考えている。近年では、ヒアルロン酸は癌や創傷治癒との関係が注目されている。ヒアルロン酸は腫瘍進行の過程で異常に蓄積し、結合部位である CD44 などが腫瘍中で亢進され、これらが腫瘍形成において協同して働いている可能性が考えられている。また、ヒアルロン酸が細胞をコートすることがわかり、このコートによって創傷治癒に必要な細胞の増殖と再構成を促進することも明らかとなり^{19,20)}、ヒアルロン酸の臨床応用が進んでいる。皮膚では、2010 年に線維芽細胞や表皮細胞にグルコシルチコイドを添加することで、ヒアルロン酸合成酵素の発現が抑制されることが報告された²¹⁾。また、表皮細胞において高分子ヒアルロン酸により分化が誘導されることも報告されている²²⁾。ヒアルロン酸オリゴ糖に関しては、軟骨細胞に六糖ヒアルロン酸オリゴを添加することで、toll-like-4 受容体 (TLR4) および CD44 を介して炎症が誘導されるという報告もある²³⁾。

多様な作用が報告されているヒアルロン酸は、現在も美容や医療などの様々な分野で研究が行われている。しかし、ヒアルロン酸オリゴ糖の皮膚での機能解析はほとんど報告がない。そこで、ヒアルロン酸の最小単位である 4 糖から成るヒアルロン酸オリゴ糖 (hyaluronan tetrasaccharides、HA4) に注目し、皮膚での機能解析を行うことにより、美容や医療の分野での新規適応法を見出すことを大きな目的とした。本研究では、HA4 の皮膚透過性を検討し、マウスを用いた *in vivo* 皮膚適用における皮膚機能を評価すること、また、HA4 の線維芽細胞および表皮細胞における生理作用を調べ、分子レベルでそのメカニズムを明らかにすること、これらを、一般的な高分子ヒアルロン酸との違いを含め、有用性を比較検討することを目的とした。

第 1 章では、HA4 の皮膚透過性と皮膚機能に及ぼす影響として、まず、HA4 の受動拡散における皮膚透過性を検討した。また、*in vivo* での HA4 皮膚適用

における、皮膚計測機器を用いた皮膚機能評価を行った。

第 2 章では、HA4 による線維芽細胞のヒアルロン酸生成に及ぼす影響として、HA4 のヒアルロン酸合成酵素遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。また、*in vivo* での HA4 皮膚適用における、皮膚内ヒアルロン酸の組織学的観察および定量を行った。

第 3 章では、HA4 による表皮細胞の分化に及ぼす影響として、HA4 の分化マーカー発現に及ぼす影響および分化誘導とリン酸化 CD44 の関係を検討した。

以下に、得られた結果を報告する。

第 1 章 HA4 の皮膚透過性と皮膚機能に及ぼす影響

第 1 節 緒論

皮膚の最外層に位置する角層は、体内からの水分の蒸散を防ぎ、体内への異物やウイルスなどの侵入を防ぐ強固なバリアであり、生命を維持するために重要である。したがって、化合物を皮膚から送達する上では、角層が大きな障壁となる。化合物を皮膚に適用したとき、通常、受動拡散による物質の皮膚透過は角層のバリアを通る。一般的に、脂溶性化合物の皮膚透過性は水溶性化合物よりも高く、分子量も化合物の皮膚透過には重要な因子である。一般的に、分子量が 500 Da 以下であれば、皮膚透過を制御することができる²⁴⁾。しかし、アトピー性皮膚炎のような皮膚のバリア機能に障害がある場合、アトピー性皮膚炎の治療薬であるタクロリムス（分子量 804 Da）は、皮膚へ浸透することが報告されている²⁵⁾。このことから、分子量が 500 Da 以上であっても、皮膚を透過する可能性はある。

地球上に到達する UVA の照射量は UVB 照射量の約 20 倍で、太陽からの UVA は光老化や紫外線による発癌に関与している。皮膚への UVB 照射によって、紅斑の誘導や表皮細胞の過剰増殖、皮膚バリア機能の変化など、様々な反応が誘導される。UV は、皮膚の透過性バリア機能を破壊する。この皮膚の透過性バリア機能の減少は、UVB および UVA-UVB、UVC によっても引き起こされる。その結果、UV 照射により、ヒトやラット皮膚からの物質の経皮吸収を増加させることが知られている²⁶⁾。

ヒアルロン酸は、分子量が 10 万を越える高分子の非硫酸グリコサミノグリカンである。ヒアルロン酸は水と強く結合することから、化粧品や医薬品原料として広く使用されている。化粧品に配合されているヒアルロン酸は、皮膚表面

に膜を形成することで皮膚からの水分の蒸散を防ぐ。また、ヒアルロン酸注入は、加齢によるシワやライン、瘢痕、その他の外傷性または生まれつきの傷痕など、皮膚の外見を改善するために用いられていることは、よく知られている。しかし、ヒアルロン酸は水溶性が高く、通常は高分子量での分子量分布を持つことから、経皮的に皮膚内に送達させることは困難である。

そこで本章では、ヒアルロン酸の中でも分子量の小さい HA4 に注目し、*in vitro* 皮膚透過試験を行い、HA4 皮膚透過の基礎的検討を行った。また、*in vivo* での HA4 皮膚適用における、皮膚計測機器を用いた皮膚機能評価を行った。

第2節 実験方法

2-1. 実験材料

HA4 (99.14%) (776.3 Da) は糖質科学研究所（東京、日本）より、高分子ヒアルロン酸 Na (hyaluronan、HA) (平均分子量 1,200 kDa) および低分子ヒアルロン酸 Na (low molecular weight hyaluronan、L-HA) (平均分子量 33 kDa) は資生堂リサーチセンター（横浜、神奈川、日本）より供与された。ヒアルロン酸測定キットは生化学バイオビジネス（東京、日本）より購入した。その他の試薬は、市販の特級もしくは HPLC 用のものを、和光純薬工業（大阪、日本）より購入した。

2-2. 実験動物

雄性ヘアレスマウス（HR-1、7 週令、体重：23 - 30 g）は、株式会社星野試験動物飼育所（坂東、茨城、日本）より購入した。12 時間ごとに明暗サイクル（on-off 時間：7:00 - 19:00）を設定した部屋で飼育し、水と餌は自由に摂取可能とした。なお、動物実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾を得て、「城西大学動物実験規定」に従った。

2-3. 皮膚透過サンプルの調製

HA4 水溶液は、精製水で 0.02、0.1、0.5%の濃度のものを調製した。HA4 水溶液の pH 調整には、ギ酸および 1.5 M ギ酸アンモニウムを使用した。HA および L-HA 水溶液は、精製水で 0.5%の濃度のものを調製した。

2-4. 皮膚透過膜の準備

ヘアレスマウス（8 - 10 週令）を頸椎脱臼し、腹部の正中線を避けるように皮

膚を摘出して、真皮側の脂肪を丁寧に取り除いた。*In vitro* 皮膚透過試験には、全層皮膚およびテープストリッピングにより角層を取り除いた角層剥離皮膚の二種類を用いた。角層剥離皮膚は、皮膚を摘出する前にニチバンのカートンテープ No.640 (東京、日本) で角層を全て取り除いて作成した。

2-5. *In vitro* 皮膚透過試験

摘出した皮膚は、有効透過面積 1.77 cm^2 (直径 : 1.5 cm) の縦型拡散セルに、表皮をドナー側、真皮をレシーバ側にして装着した。ドナー側に各濃度の HA4 水溶液 1 mL を、レシーバ側に精製水 5 mL を適用した。拡散セル内は $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ に保ち、スターラーで攪拌した。経時的にレシーバ液 $300\text{ }\mu\text{L}$ をサンプリングし、その都度、同量の精製水を補充した。レシーバ液中の HA4 を定量し、希積分を補正して皮膚累積透過量を算出した。

2-6. HA4 の分析

各サンプルをメタノールと 1 : 1 で混合し、 $15,000\times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 分の条件で遠心分離 (テーブルトップマイクロ冷却遠心機 3500) (KUBOTA、東京、日本) して上清を回収した。上清中の HA4 は、LC/MS/MS で測定した。LC/MS システムは、イオントラップ型タンデム質量分析装置 (LCQ DECA XP plus) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) およびポンプ (Paradigm MS4) (Microm Bioresources Inc., Auburn, CA, USA)、オートインジェクター (CTC HTS-PAL) (Microm Bioresources Inc.)、カラム (TSK-gel ODS-80Ts, $2.0\times 150\text{ mm}$) (TOSOH、東京、日本) から成り、移動相は 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 : メタノール (8 : 2)、流速を $100\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ とし、ネガティブイオン化モードで検出した。

2-7. ヒアルロン酸の定量

HA および L-HA は、ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) 法 (競合法) を利用したヒアルロン酸測定キット (測定範囲 : 12.5 - 400 ng/mL) を使用して測定した。ヒアルロン酸固相化マイクロプレートは、各ウェルあたり 300 μ L ずつの洗浄液で 3 回洗浄した。検体には、HA および L-HA の透過試験 24 時間後のレシーバ液を用いた。反応緩衝液をブランク (0 ng/mL)、各濃度のヒアルロン酸標準溶液 (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 ng/mL) を検量線作成のため調製した。この検体およびヒアルロン酸標準溶液を、それぞれのウェルに 50 μ L ずつ添加した。次に、ビオチン標識 HABP (hyaluronic acid binding protein) 溶液を各ウェルあたり 50 μ L ずつ添加し、プレートミキサーを用いて 1 分間混和後、37 $^{\circ}$ C で 60 分間静置した。反応後、全てのウェル内の溶液を除去し、各ウェルあたり 300 μ L ずつの洗浄液で 3 回洗浄した。全てのウェルに HRP (horseradish peroxidase) 標識ストレプトアビジン溶液を 100 μ L ずつ添加し、プレートシートで封をして 37 $^{\circ}$ C で 60 分間静置した。全てのウェル内の溶液を除去し、各ウェルあたり 300 μ L ずつの洗浄液で 5 回洗浄した。全てのウェルに酵素基質溶液を 100 μ L ずつ添加し、アルミホイルで遮光した。常温 (15 - 25 $^{\circ}$ C) で 30 分間静置後、全てのウェルに反応停止溶液を 100 μ L ずつ添加した。プレートミキサーで数秒間混和し、30 分以内にマイクロプレートリーダーで吸光度 (測定波長 : 429 nm、対照波長 : 630 nm) を測定した。

2-8. *In vivo* 実験

ヘアレスマウス (7 - 8 週令) を UVA 未照射群および照射群に分け、さらに、未処理群 (Normal/UVA(-)) および溶媒塗布群 (Control/UVA(-)、Control/UVA(+))、HA 塗布群 (HA/UVA(-)、HA/UVA(+))、HA4 塗布群

(HA4/UVA(-)、HA4/UVA(+)) の計 7 群 (n=3) に分けて検討を行った (Table 1)。溶媒として 70% エタノールを用い、HA および HA4 は各々 0.1% の溶液を調製した。UVA 照射群には、高性能 UV トランスイルミネータ UVP® (フナコシ、東京、日本) を用いて、背部皮膚に UVA を 22.3 J/cm²/day 照射した。UVA 照射は 1 週間に 5 回、計 3 週間行った。UVA 照射後に、角層水分量および TEWL、粘弾性を測定し、各サンプルを 50 µL ずつ塗布した。

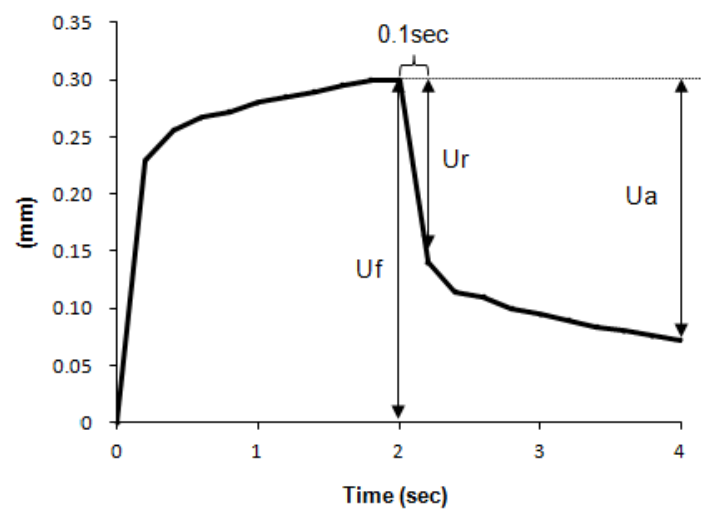
Table 1. *In vivo* experimental groups

Group	Sample	UVA irradiation (22.3 J/cm ²)
Normal	—	—
Control/UVA(-)	70% ethanol	—
HA/UVA(-)	0.1% HA (70% ethanol)	—
HA4/UVA(-)	0.1% HA4 (70% ethanol)	—
Control/UVA(+)	70% ethanol	+
HA/UVA(+)	0.1% HA (70 % ethanol)	+
HA4/UVA(+)	0.1% HA4 (70% ethanol)	+

2-9. 皮膚機能の測定

角層水分量および粘弾性の測定には、Cutometer® MPA 580 (Courage+Khazaka、Mathias-Brüggen-Str., Köln, Germany) を使用した。TEWL の測定には、VAPO SCAN AS-VT100RS (株式会社アサヒテクノラボ、横浜、神奈川、日本) を使用した。角層水分量および TEWL の測定は、1 週間に 5 回、計 3 週間行った。粘弾性の測定は、1 週間に 1 回、計 3 週間行い、測定時には 12 倍に希釈したペントバルビタールナトリウムを 0.1 mL /100 g で腹腔内に投与し、麻酔下で測定した。粘弾性の評価には、吸引法による R0、R2、R7 の値を用いた。R0 (Uf) は最大吸引の高さで皮膚の伸展能を表し、やわらか

さの指標となる。 $R2 (Ua/Uf)$ は測定終了時の戻り率、 $R7 (Ur/Uf)$ は開放後 0.1 秒時の戻り率で、粘弾性のうち弾性の部分を反映しやすい (Scheme 1)。本検討では、陰圧状態 (250 mbar) で 2 秒間、開放後に 2 秒間、計 4 秒間、皮膚の変異を測定した。なお、全ての測定値は各皮膚を 3 回測定し、平均の値で評価した。



Scheme 1 吸引法による皮膚の変異挙動例

2-10. 皮膚の組織学的観察

実験最終日にヘアレスマウスからサンプル塗布部位の皮膚を摘出し、ドライアイスで急速冷却しながら O.C.T. (optimal cutting temperature) コンパウンドに包埋し、凍結切片を作成した。凍結切片はミクロトーム Leica CM 3050 S (Leica Microsystems, Inc., Wetzlar, Hessen, Germany) を使用し、10 μm の薄切切片を作成した。薄切切片は、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin-eosin, HE) 染色を行い、皮膚組織形態を観察した。

薄切切片を 10% ホルマリン溶液に 30 分ほど浸漬し、組織の固定を行った。

水洗後、100、90、80、70% エタノールに順次浸け、脱水した。水洗後、ヘマトキシリン液に10分間浸漬した。再度水洗後、酢酸を含んだエオシン液に浸け、直ぐに色出しのため水洗した。次に、70、80、90、100% エタノールに順次浸け、3回キシレンに浸けて透徹後、封入を行い顕微鏡で観察した。

2-11. 表皮厚の計測

HE 染色を行った皮膚切片を、倒立型リサーチ顕微鏡 IX71 (OLIMPUS、東京、日本) を使用して観察した。表皮厚は、組織切片ごとに約 50 ヶ所以上測定し、平均の厚みで評価した。

2-12. データ解析

SAS 統計解析システム ver. 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用し、 p 値を算出した。統計解析法には、Tukey の多重検定を用いた。

第3節 結果

3-1. 全層皮膚および角層剥離皮膚を用いた HA4 の皮膚透過

HA4 の受動拡散における皮膚透過性を、全層皮膚および角層剥離皮膚を用いて評価した。まず、0.5% HA4 水溶液の皮膚透過に対する角層の有無による影響を検討した。その結果、8 時間後の HA4 累積透過量は、全層皮膚で $0.8 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、角層剥離皮膚で $2109.6 \pm 175.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ と、全層皮膚と比べて角層剥離皮膚で約 2600 倍増加した (Fig. 2)。Flux および透過係数も、全層皮膚と比べて角層剥離皮膚で高い値を示した (Table 2)。

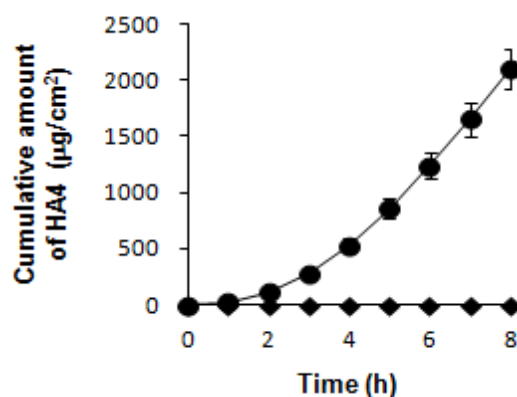


Fig. 2. Passive permeation of HA4. Cumulative amount of HA4 permeated through full-thickness skin and SC-stripped skin. Each point represents the mean \pm S.D. of 3 to 5 determinations. Symbols: Full-thickness skin (◆) and SC-stripped skin (●).

Table 2. *In vitro* skin permeation of HA4 through full-thickness skin and SC-stripped skin

	Cumulative amount of HA4 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	$\times 10^{-7}$ P (cm/s)	ER
Full-thickness skin	0.8 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	-
SC-stripped skin	2109.6 ± 175.9	418.0 ± 30.6	232.2 ± 17.0	2587.5

ER = Enhancement ratio = cumulative amount of HA4 through SC-stripped skin / cumulative amount of HA4 through full-thickness skin

次に、0.02、0.1、0.5% HA4 水溶液を全層皮膚および角層剥離皮膚に適用し、HA4 皮膚透過量の濃度依存性を調査した。その結果、全層皮膚における 8 時間後の HA4 累積透過量は、0.02% HA4 水溶液で $0.1 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.1% HA4 水溶液で $0.2 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.5% HA4 水溶液で $0.8 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった (Fig. 3a)。角層剥離皮膚における 8 時間後の HA4 累積透過量は、0.02% HA4 水溶液で $58.3 \pm 10.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.1% HA4 水溶液で $392.4 \pm 44.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.5% HA4 水溶液で $2364.8 \pm 46.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった (Fig. 3b)。Flux および透過係数も、濃度が濃くなるにつれて増加した (Table 3)。

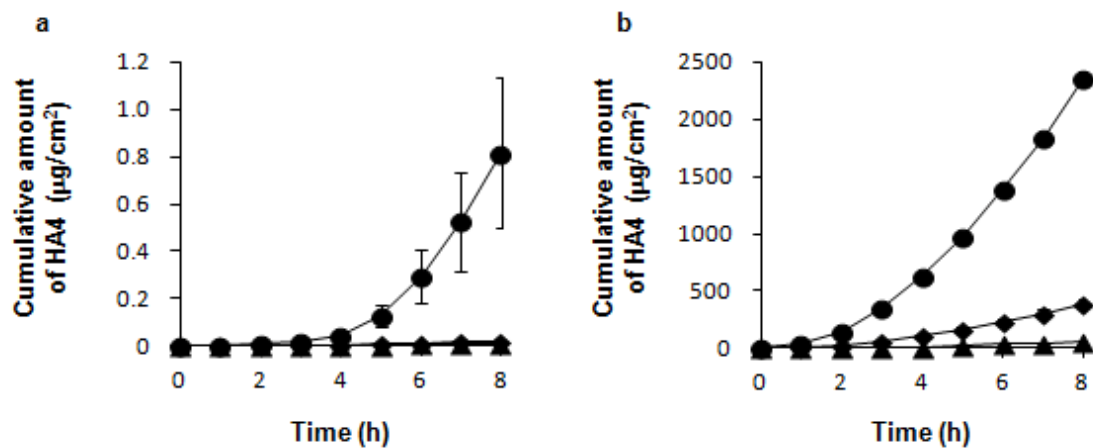


Fig. 3. Effect of HA4 concentrations on the *in vitro* skin permeation of HA4 through full-thickness skin and SC-stripped skin. Cumulative amount of HA4 permeated through full-thickness skin (a) and SC-stripped skin (b). Each point represents the mean \pm S.D. of 3 to 5 determinations. Symbols: 0.02 (▲), 0.1 (◆) and 0.5% (●) HA4 solutions.

Table3. *In vitro* skin permeation of HA4 through and full-thickness skin and SC-stripped skin from different concentrations

	HA4 concentration (%)	Cumulative amount of HA4 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	$\times 10^{-7}P$ (cm/s)	ER
Full-thickness skin	0.50	0.8 \pm 0.3	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.05	67.9
	0.10	0.2 \pm 0.1	0.003 \pm 0.001	0.009 \pm 0.003	1.9
	0.02	0.1 \pm 0.1	0.003 \pm 0.002	0.03 \pm 0.02	-
	HA4 concentration (%)	Cumulative amount of HA4 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	$\times 10^{-7}P$ (cm/s)	ER
SC-stripped skin	0.50	2364.8 \pm 46.5	461.6 \pm 10.0	256.4 \pm 5.6	40.6
	0.10	392.4 \pm 44.3	76.8 \pm 6.9	213.3 \pm 19.2	6.7
	0.02	58.3 \pm 10.7	12.0 \pm 2.2	166.7 \pm 31.0	-

ER=Enhancement ratio=cumulative amount of HA4/ cumulative amount of 0.02% HA4

3-2. pH 変化における HA4 の皮膚透過

0.5% HA4 水溶液の、皮膚透過に及ぼす pH による影響を検討した。pH 4 および pH 7 の HA4 水溶液を全層皮膚に適用した結果、8 時間後の HA4 累積透過量は、pH 4 の HA4 水溶液で $0.78 \pm 0.37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、pH 7 の HA4 水溶液で $0.07 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となった (Fig. 4)。pH 7 の HA4 水溶液と比べて pH 4 の HA4 水溶液では、HA4 累積透過量は約 11 倍増加した。Flux および透過係数も、pH 7 と比べて pH 4 の HA4 水溶液の方が高い値を示した (Table 4)。

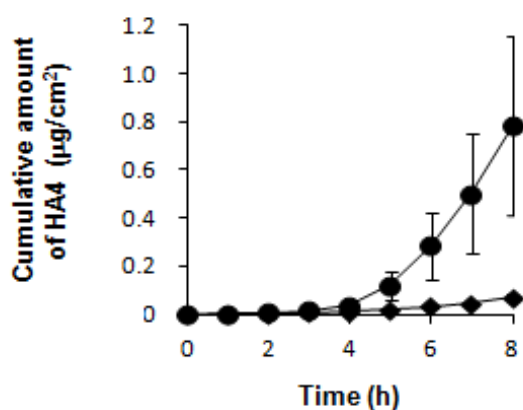


Fig. 4. Effect of pH on the *in vitro* skin permeation of HA4. Cumulative amount of HA4 permeated through full-thickness skin. Each point represents the mean \pm S.D. of 3 to 5 determinations. Symbols: pH 4 (●) and pH 7 (◆) HA4 solutions.

Table 4. *In vitro* skin permeation of HA4 through full-thickness skin from different pH solution

pH	Fraction Unionized	Cumulative amount of HA4 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	$\times 10^{-7} P$ (cm/s)	ER
4	0.09	0.8 ± 0.4	0.2 ± 0.1	0.12 ± 0.06	11.3
7	0.0001	0.1 ± 0.01	0.03 ± 0.004	0.01 ± 0.01	-

Fraction un-ionized = $1 / (1 + \text{antilog}(\text{pH} - \text{pKa}))$.

ER = Enhancement ratio = cumulative amount of HA4 at pH 4 / cumulative amount of HA4 at pH 7

3-3. 分子量の違いによるヒアルロン酸の皮膚透過量の比較

0.5% HA4、L-HA、HA 水溶液を全層皮膚に適用し、様々な分子量のヒアルロン酸の皮膚透過量の違いを調査した。その結果、24 時間後の累積透過量は、HA4 水溶液で $2402.4 \pm 770.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、L-HA 水溶液で $26.9 \pm 14.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、HA 水溶液で $0.9 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった (Fig. 5)。

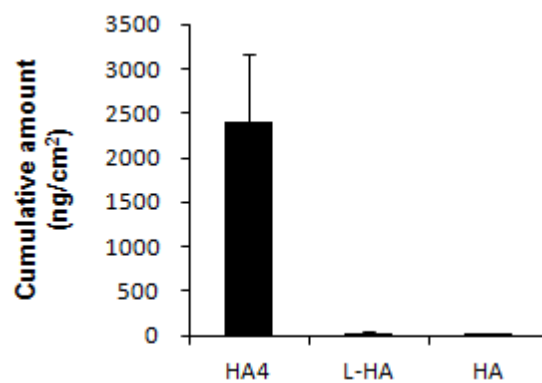


Fig. 5. Effect of molecular weight on the *in vitro* skin permeation of HA4, L-HA and HA. Cumulative amount of each samples permeated through full-thickness skin over 24 h. Values were the mean \pm S.D of three experiments.

3-4. HA および HA4 塗布における角層水分量および TEWL、粘弾性の変化

In vivo 皮膚適用における HA および HA4 の皮膚に及ぼす影響を、角層水分量および TEWL、粘弾性から評価した。その結果、UVA 未照射群では、Control/UVA(-)群および HA/UVA(-)群と比べて HA4/UVA(-)群で角層水分量が増加した (Fig. 6a)。一方、Control/UVA(-)群と HA/UVA(-)群の間では変化はみられなかった。TEWL および粘弾性は、全ての群で変化はみられなかった (Fig. 7a, 8a-c)。UVA 照射群では、Normal/UVA(-)群と比べて Control/UVA(+)群で、角層水分量は低下し、TEWL は増加した。一方、HA4/UVA(+)群では、Control/UVA(+)および HA/UVA(+)と比べて角層水分量は増加し (Fig. 6b)、TEWL は減少した (Fig. 7b)。粘弾性は、Control/UVA(+)群および HA/UVA(+)群と比べて HA4/UVA(+)群で R0 が増加した (Fig. 8d)。UVA 未照射群および照射群共に、体重に変化は認められなかった (Fig. 9)。

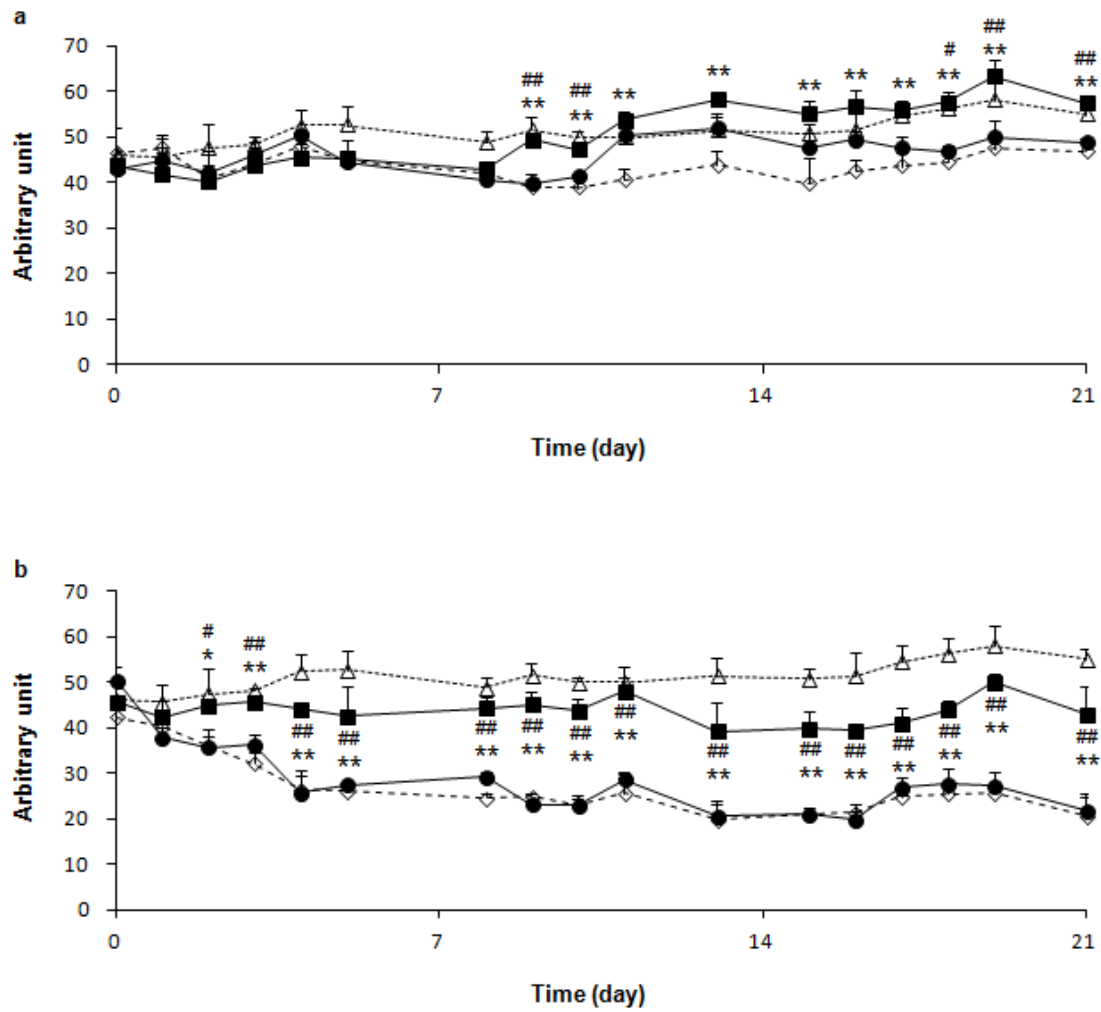


Fig. 6. Changes in water content in the SC after HA4 treatment. Water content in the SC was measured for 0-21 days in non-UVA-irradiated mice (a) and UVA-irradiated mice (b). Values were the mean \pm S.D of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (versus control), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ (versus HA), Tukey's *post-hoc* multiple comparison test. Symbols: normal (Δ), control (\diamond), HA (\bullet) and HA4 (\blacksquare) groups.

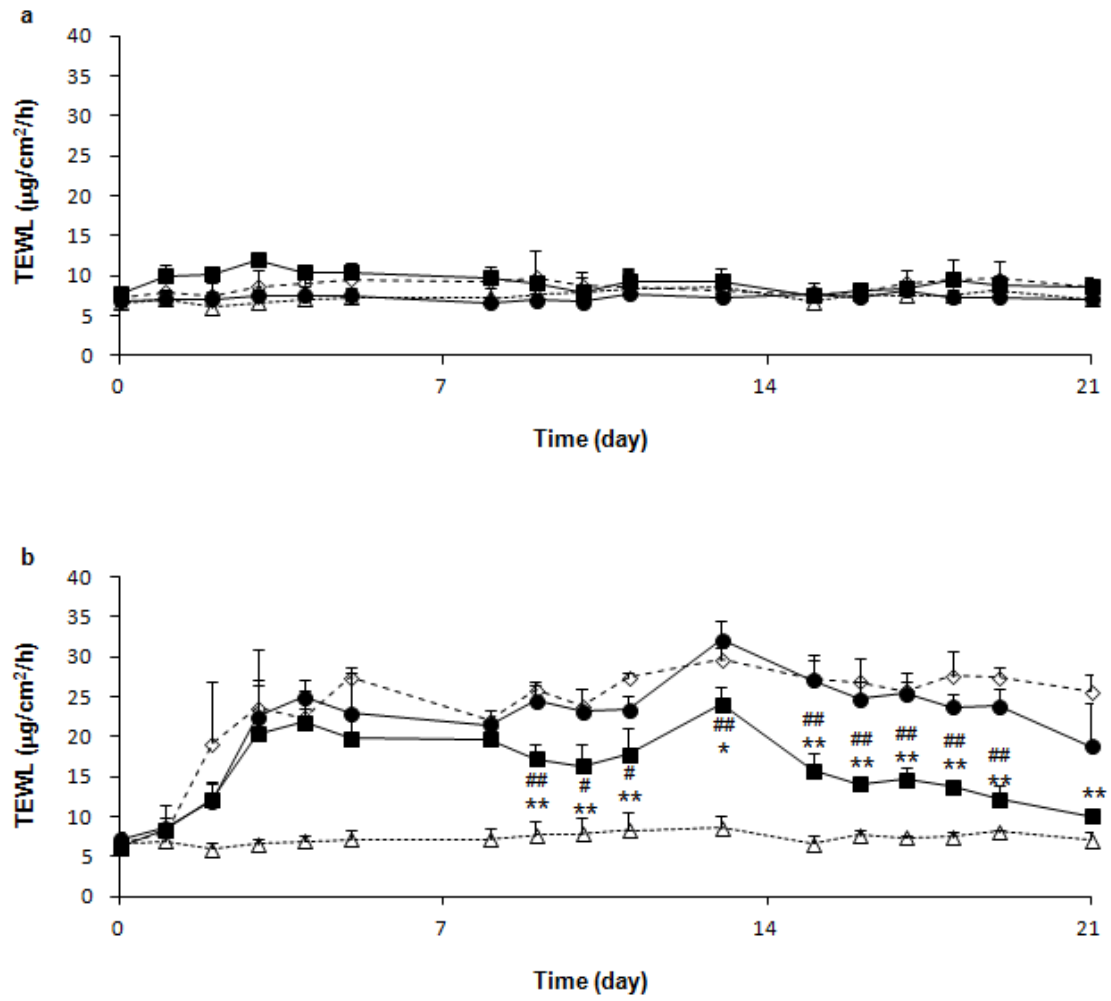


Fig. 7. Changes in TEWL after HA4 treatment. TEWL was measured for 0-21 days in non-UVA-irradiated mice (a) and UVA-irradiated mice (b). Values were the mean \pm S.D of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (versus control), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ (versus HA), Tukey's *post-hoc* multiple comparison test. Symbols: normal (Δ), control (\diamond), HA (\bullet) and HA4 (\blacksquare) groups.

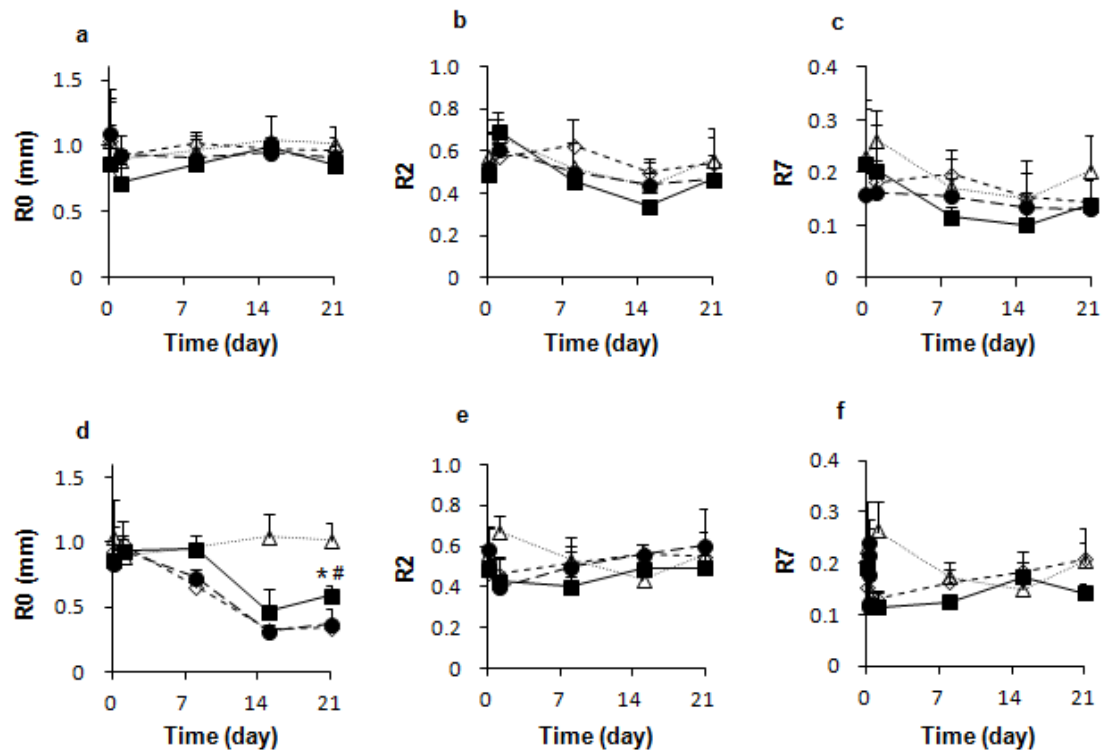


Fig. 8. Changes in skin viscoelasticity after HA4 treatment. Skin viscoelasticity was measured for 0-21 days in non-UVA-irradiated mice (a-c) and UVA-irradiated mice (d-f). Values were the mean \pm S.D of three experiments. * $p < 0.05$ (versus control), # $p < 0.05$ (versus HA), Tukey's *post-hoc* multiple comparison test. Symbols: normal (Δ), control (\diamond), HA (\bullet) and HA4 (\blacksquare) groups.

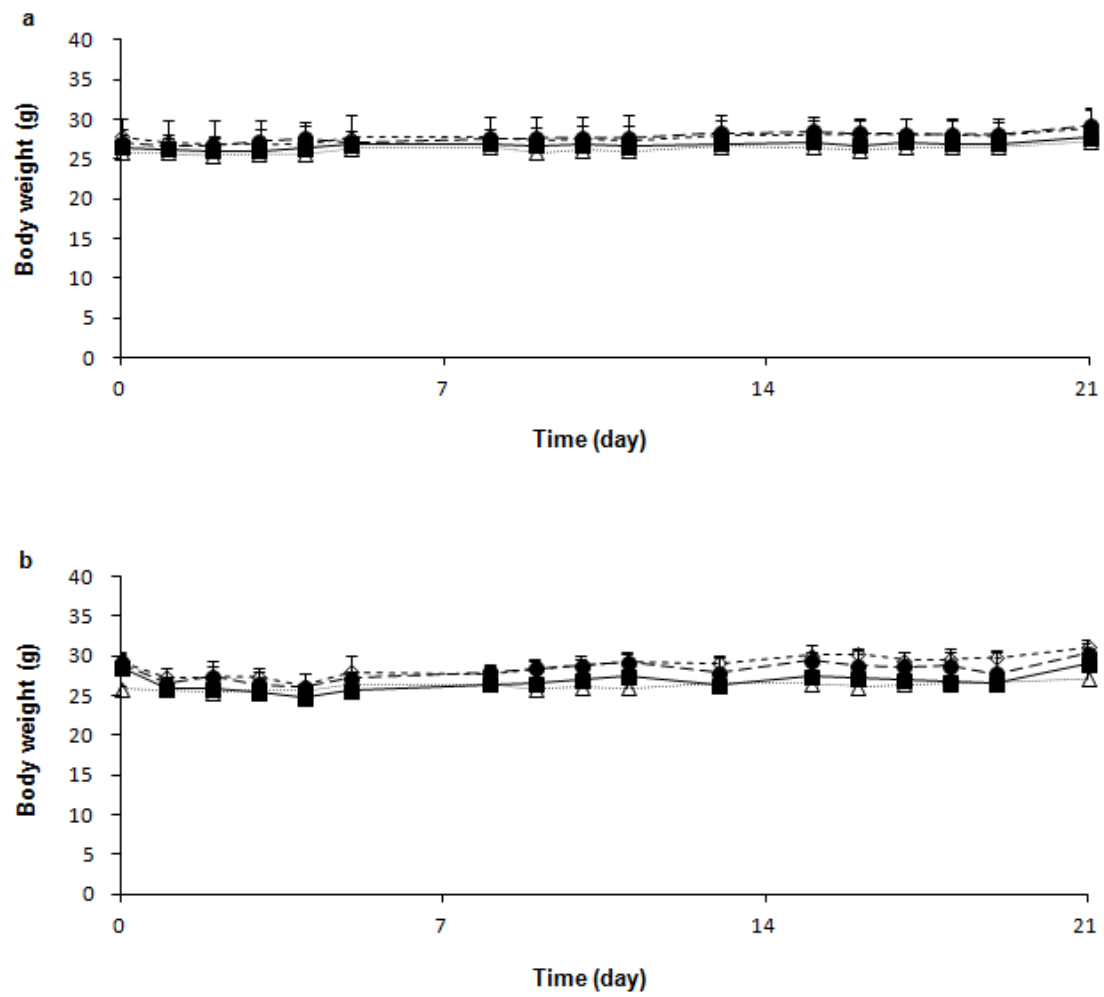


Fig. 9. Changes in body weight after HA4 treatment. Body weight was measured for 0-21 days in non-UVA-irradiated mice (a) and UVA-irradiated mice (b). Values were the mean \pm S.D of three experiments. Symbols: normal (Δ), control (\diamond), HA (\bullet) and HA4 (\blacksquare) groups.

3-5. HA および HA4 塗布における表皮厚の変化

In vivo 皮膚適用における HA および HA4 の皮膚に及ぼす影響を組織学的に評価するため、HE 染色を行い、皮膚組織の観察および表皮厚を測定した。その結果、UVA 未照射群では、Normal/UVA(-)群と比べて Control/UVA(-)群でわずかに表皮の肥厚が観察された (Fig. 10c, d)。一方、HA4/UVA(-)群は、Normal/UVA(-)群とほとんど変わらない皮膚組織が観察された (Fig. 10c, f)。表皮厚を測定した結果、Normal/UVA(-)群で $24.2 \pm 1.3 \mu\text{m}$ 、Control/UVA(-)群で $36.4 \pm 3.8 \mu\text{m}$ 、HA/UVA(-)群で $29.5 \pm 2.4 \mu\text{m}$ 、HA4/UVA(-)群で $22.8 \pm 5.1 \mu\text{m}$ であった (Fig. 10a)。UVA 照射群では、Normal/UVA(-)群と比べて Control/UVA(+)群および HA/UVA(+)群で表皮の肥厚が観察された (Fig. 10c, g, h)。一方、HA4/UVA(+)群は、Normal/UVA(-)群により近い皮膚組織が観察された (Fig. 10c, i)。表皮厚を測定した結果、Control/UVA(+)群で $177.3 \pm 34.6 \mu\text{m}$ 、HA/UVA(+)群で $108.6 \pm 20.3 \mu\text{m}$ 、HA4/UVA(+)群で $62.5 \pm 39.4 \mu\text{m}$ であった (Fig. 10b)。

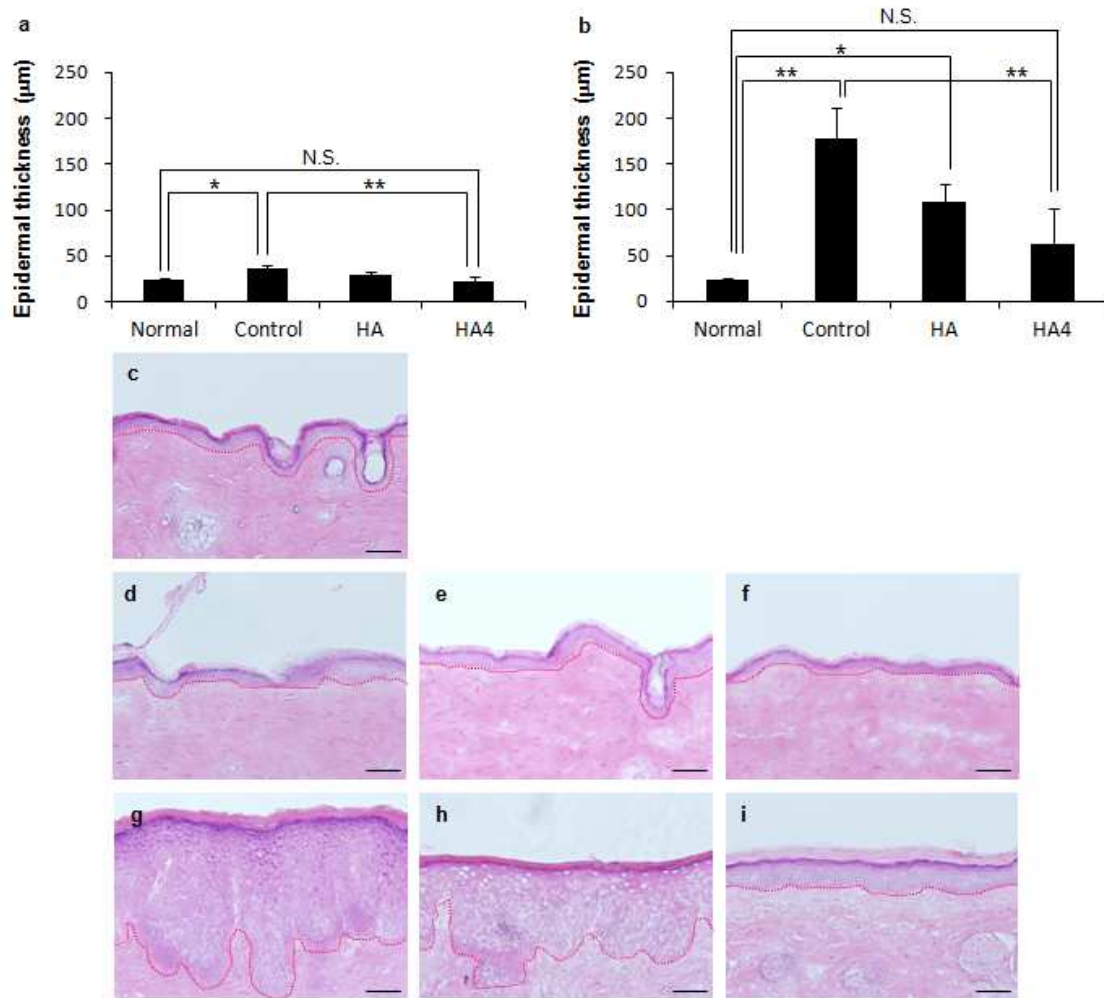


Fig. 10. Changes in epidermal thickness and skin morphology after HA4 treatment. Epidermal thickness and skin morphology were treated for 21 days in non-UVA-irradiated mice (a, d-f) and UVA-irradiated mice (b, g-i). Skin samples were fixed and stained with HE. HE-stained sections were photographed, and epidermal thickness was assessed (a, b). Non-UVA-irradiated skin specimens of normal (c), control (d), HA (e), and HA4 (f) groups after each sample treatment. UVA-irradiated skin specimens of control (g), HA (h), and HA4 (i) groups after each sample treatment and irradiation. Bar = 50 μ m. Values were the mean \pm S.D of three experiments. N.D., not determined. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Tukey's *post-hoc* multiple comparison test.

第4節 考察

ヒアルロン酸は水溶性で平均分子量が 10 万を越える高分子であるため、皮膚へ浸透しないとされている。そこで本章では、ヒアルロン酸の最小単位である HA4 の皮膚透過性について検討した。その結果、HA4 は受動拡散で皮膚を透過することが明らかとなった。一方、L-HA (33 kDa) および HA (1200 kDa) は、受動拡散では皮膚をほぼ透過しないことが確認できた。

薬物の皮膚透過経路には、毛包や汗腺などの付属器官を介する経付属器官経路と、角層実質を透過する経表皮経路がある。経付属器官経路による皮膚透過は皮膚実質を通るより速やかであるが、皮膚表面積に対する付属器官の割合が 0.1%程度であるため、定常状態における付属器官からの薬物透過の寄与は小さい。したがって、薬物を皮膚内へ送達させるためには角層を透過させることが重要である。角層を除いた皮膚では、FITC (fluorescein isothiocyanate)-デキストラン (FD10) (分子量 9.6 kDa) のような高分子物質でも皮膚を透過することが報告されている²⁷⁾。このことから、薬物の皮膚透過には角層バリアが律速となることがわかる。本研究で、全層皮膚における 8 時間後の HA4 累積透過量は $0.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、透過係数は $0.1 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ 、lag time は 4.6 h であった。一方、角層剥離皮膚における 8 時間後の HA4 累積透過量は $2109.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、透過係数は $232.2 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ 、lag time は 2.9 h であった (Fig. 2, Table 2)。全層皮膚における 8 時間後の HA4 累積透過量は、角層剥離皮膚と比べて約 2600 倍小さいが、HA4 は受動拡散で皮膚を透過することが明らかとなった。角層剥離皮膚で HA4 の透過量が大幅に増加したことから、HA4 の皮膚透過には角層が大きな律速となっていることが考えられる。それにも関わらず、全層皮膚と比べて角層剥離皮膚でも lag time は急激に増加していないことから、HA4 は皮膚への分配および拡散の両方が遅いことが考えられる。

全層皮膚での8時間後のHA4累積透過量は、0.02% HA4水溶液と比べて0.1% HA4水溶液で約2倍、0.1% HA4水溶液と比べて0.5% HA4水溶液で約37倍と、濃度依存性はみられなかった (Fig. 3a)。そして、flux および透過係数にも濃度依存性はみられなかった (Table 3)。一方、角層剥離皮膚での8時間後のHA4累積透過量は、0.02% HA4水溶液と比べて0.1% HA4水溶液で約6倍、0.1% HA4水溶液と比べて0.5% HA4水溶液で約7倍と、濃度依存的に皮膚を透過することが示された (Fig. 3b)。全層皮膚では角層が存在することで、低濃度の場合は定常状態に達するまでに時間がかかり、0.02 および 0.1% HA4 水溶液では、試験時間が8時間では不十分であったことが考えられる。しかし、0.5% HA4 水溶液で、24時間定期的にサンプリングを行い皮膚透過量を評価したところ、8時間で定常状態に達していることを確認している。これらの結果より、HA4は濃度が高いほど、皮膚透過性が高くなることが示された。なお、0.1 および 0.5% HA4 水溶液の pH はほぼ変化しなかったことから、HA4の濃度依存的に皮膚透過量が増加したのは、pHの影響ではなく濃度変化によることが考えられる。

一般的に、薬物の経皮吸収は pH 分配仮説に従い、分子型が多いほど皮膚を透過する。サリチル酸の flux は溶媒の pH に依存し、透過量はサリチル酸のイオン化の程度に関与することが報告されている²⁸⁾。ヒアルロン酸の pK_a は3である^{29, 30)}。Henderson-Hasselbalch の式より、pH 4のときのヒアルロン酸の分子型分率は9.09%、pH 7のときの分子型分率は0.01%と計算され、pH 7と比べて pH 4で分子型の割合が多い。HA4の皮膚透過も pH 分配仮説に従い、pH 7のHA4水溶液と比べて pH 4のHA4水溶液でHA4累積透過量が増加した (Fig. 4)。

アルロン酸は水溶性が高く分子量が大きいため、皮膚を透過しないといわれ

ている。これを確認するために、低分子量の L-HA および高分子量の HA の皮膚透過試験を行った。その結果、L-HA および HA は、ほぼ皮膚を透過しないことが示された (Fig. 5)。わずかにヒアルロン酸量が確認されたが、ドナー液を適用せずに透過試験を行った際のレシーバ液からもヒアルロン酸が検出されたことから、皮膚内のヒアルロン酸が溶出したものであることが考えられる。ここまでの結果より、HA4 は皮膚適用で皮膚内に浸透し、生理活性を示す可能性があることが示唆された。

HA4 が受動拡散で皮膚を透過したことから、次に、*in vivo* での皮膚適用における HA4 の皮膚に及ぼす影響を調査した。その結果、HA4 は UVA 照射後の皮膚機能改善に関与することが明らかとなった。

ヘアレスマウス皮膚に UVA を照射すると、角層の水分量が減少する³¹⁾。また、ヘアレスマウス背部皮膚に UVB を長期間照射すると TEWL が増加するという報告がある^{32, 33)}。TEWL とは皮膚からの水分の蒸散量を表しており³⁴⁾、皮膚の重要な機能の一つであるバリア機能の指標に用いられている。本研究で、UVA 未照射群では、Normal/UVA(-)群と比べて HA4/UVA(-)群で、早い時期から角層水分量が増加した (Fig. 6a)。ヒアルロン酸は水分保持機能が強く、HA4 は皮膚適用することで皮膚内へ浸透し、HA4 がわずかながら水分を保持することで角層水分量が増加したと考えられる。UVA 照射群では、Normal/UVA(-)群と比べて Control/UVA(+)群で角層水分量は減少し (Fig. 6b)、TEWL は増加した (Fig. 7b)。一方、HA4/UVA(+)群は Control/UVA(+)群および HA/UVA(+)群と比べて、角層水分量および TEWL の回復が顕著であった (Figs. 6b, 7b)。また、粘弾性の評価では、UVA 未照射群内の変化は認められず、UVA 照射群では、HA4/UVA(+)群は Control/UVA(+)群および HA/UVA(+)群と比べて、やわらかさの指標である R0 が増加した (Fig. 8d)。ヘアレスマウスに慢性的に UVA を照射

すると、皮膚の厚みが増加することが報告されている³⁵⁾。本研究でも、UVA 照射により表皮の厚みが増加し、Normal/UVA(-)群と比べて Control/UVA(+)で約 7.3 倍、表皮の厚みが増加した。一方、HA4/UVA(+)群は Control/UVA(+)群および HA/UVA(+)群と比べて、表皮の肥厚が小さかった (Fig. 10b)。また、UVA 未照射群でも、Normal/UVA(-)群と比べて Control/UVA(-)で約 1.5 倍、表皮の厚みが増加した。一方、HA4/UVA(-)群および HA4/UVA(+)群共に、表皮の厚みは Normal/UVA(-)群と有意な差は認められなかった (Fig. 10a)。

第 1 章より、HA4 は受動拡散で皮膚を透過するが、皮膚への分配・拡散は遅いことが示された。しかし、水溶性高分子であるヒアルロン酸の中でも、分子量の小さい HA4 は皮膚を透過することが明らかとなった。また、HA4 は UVA 照射による皮膚機能損傷を改善することが示された。このことから、HA4 は UVA 照射後の、皮膚機能改善プロセスに関与することが示唆された。本章の結果より、HA4 は皮膚内で何らかの生理活性を示すことが考えられる。例えば、高分子のヒアルロン酸は表皮細胞の分化を誘導することが報告されていることから³⁶⁾、HA4 も表皮細胞分化を誘導する可能性が考えられる。これにより、表皮バリア機能が回復し、TEWL や表皮の肥厚が改善したと考えられる。また、真皮の線維芽細胞には細胞周囲のヒアルロン酸の状況の変化に反応して、自らのヒアルロン酸生成量を制御する機構を有している。線維芽細胞の表面のヒアルロン酸を分解 (低分子化)・除去することで、ヒアルロン酸生成が亢進することが報告されていることから^{37, 38)}、HA4 もヒアルロン酸生成を亢進する可能性が考えられる。これにより、表皮細胞や線維芽細胞のヒアルロン酸生成を刺激したことで皮膚内ヒアルロン酸量が増加し、角層水分量が改善したと考えられる。また、表皮細胞分化を誘導していたとすれば、セラミドや天然保湿因子 (natural moisturizing factor、NMF) が増加して角層水分量が改善した可能性

も考えられる。ヒト皮膚に UV を照射すると角層中セラミド量は増加し、この増加はバリア機能改善に関与していると考えられている。実際に本研究において、UVA 照射ヘアレスマウスの角層中セラミド量は、Normal/UVA(-)群と比べて Control/UVA(+)群で増加し、さらに HA4/UVA(+)群では Control/UVA(+)群よりも角層中セラミド量が増加した結果が得られている。このことから、HA4 が示す様々な生理作用が、UVA 照射により損傷した皮膚の改善に関与していることが考えられる。

次章からは、皮膚内における HA4 の生理作用を解明するために、*in vitro* および、または *in vivo* による検討を行った。

第2章 HA4による線維芽細胞の ヒアルロン酸生成に及ぼす影響

第1節 緒論

ヒアルロン酸は細胞外マトリックスの主成分であり、生体内では恒常的にその発現が認められ、特に皮膚や関節滑液、眼の硝子体、肺、肝臓、腎臓、脳、筋肉に高濃度に存在している。生体内で最も多くヒアルロン酸が存在する皮膚では、コラーゲンやエラスチンといった線維が混在している基質の形成、細胞外組織の安定化などの生物学的機能、皮膚の水分保持以外にも弾力性の維持などの物理的役割を担っている。

ヒアルロン酸はヒアルロン酸合成酵素 (hyaluronan synthase、HAS) によって生成され、細胞外へ分泌される。HAS は真皮に存在する線維芽細胞および表皮に存在する表皮細胞で発現し、ヒト^{39,42)}およびマウス^{42, 43)}で同定されている。ヒトでは少なくとも3種類のHAS (HAS1、HAS2、HAS3) が存在し、HAS は単独でヒアルロン酸合成および分泌活性を持つことがわかっている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。ヒアルロン酸の生成は細胞増殖期に最大となり、静止期には減少する⁴⁷⁻⁵¹⁾。また、培養細胞へのヒアルロン酸添加により、細胞増殖は促進することが知られている^{48, 49)}。各HASの酵素としての比活性はHAS3 > HAS2 > HAS1の順で、HAS3 が最も高活性を有している⁵²⁾。また、HAS1 と HAS2 は平均分子量 $3 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ Da の高分子のヒアルロン酸を合成するのに対し、HAS3 は平均分子量 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ Da と、HAS1 および HAS2 と比べて比較的低分子のヒアルロン酸を合成することが報告されている⁵³⁾。しかし、表皮細胞においてサイトカインやレチノイン酸により HAS3 を特異的に誘導して生成されたヒアルロン酸を

評価したところ、HAS1 および HAS2 と変わりなく高分子ヒアルロン酸が生成されたとの報告がある^{54, 55)}。このことから、3 種の HAS がヒアルロン酸分子を造り分けるのではなく、組織や細胞によって種々の異なる HAS 発現の制御を通してヒアルロン酸生成量をコントロールしているとも考えられている。

第 1 章にて、HA4 は皮膚を透過することが明らかとなったため、皮膚内で何らかの作用を示す可能性がある。そこで本章では、HA4 による線維芽細胞のヒアルロン酸生成に及ぼす影響として、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。また、*in vivo* での HA4 皮膚適用における、皮膚内ヒアルロン酸の組織学的観察および定量を行った。

第2節 実験方法

2-1. 実験材料

HA4 (99.14%) (776.3 Da) は糖質科学研究所（東京、日本）より、HA (平均分子量 1200 kDa) および L-HA (平均分子量 33 kDa) は資生堂リサーチセンター（横浜、神奈川、日本）より供与された。ウシ胎児血清 (fetal bovine serum、FBS) は株式会社ニチレイバイオサイエンス（東京、日本）より、ダルベッコ MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium、DMEM) は和光純薬工業（大阪、日本）より購入した。RNAiso Plus および PrimeScript[®] RT reagent Kit、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] はタカラバイオ株式会社（草津、滋賀、日本）より、Primer は invitrogen（東京、日本）より、ヒアルロン酸測定キットは生化学バイオビジネス（東京、日本）または R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) のものを使用した。HABP は HOKUDO (札幌、北海道、日本) より購入した。その他の試薬は、市販の分子生物学用または生化学用、特級のものを和光純薬工業（大阪、日本）より購入した。

2-2. 使用細胞

包皮皮膚由来正常ヒト皮膚線維芽細胞は、倉敷紡績株式会社（大阪、日本）より新生児男性のものを購入した。腹部由来正常ヒト皮膚表皮細胞は Biopredic International (Rennes, France) より成人女性のものを、株式会社ケー・エー・シー（大阪、日本）経由で購入した。

2-3. 細胞培養

線維芽細胞は 100 mm ディッシュに 1×10^5 cells/dish で播種し、培養を行った。線維芽細胞は、10% FBS を含む DMEM で、37 °C、5% CO₂ 条件下でイン

キュベートした。表皮細胞は 100 mm ディッシュに 2×10^5 cells/dish で播種し、培養を行った。表皮細胞は、表皮角化細胞基礎培地に培地中最終濃度として insulin を 10 $\mu\text{g/mL}$ 、hEGF (human epidermal growth factor) を 0.1 ng/mL、hydrocortisone を 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、抗菌剤として gentamicin を 50 $\mu\text{g/mL}$ 、amphotericin B を 50 ng/mL、BPE を 0.4% v/v になるように加えた表皮角化細胞増殖用培地 (HuMedia-KG2) で、37 °C、5% CO₂ 条件下でインキュベートした。

共培養には、ポアサイズが 0.4 μm 、ポア密度が 1.0×10^8 pores/cm² の PET (polyethylene terephthalate) メンブレンで構成された BD Falcon™ セルカルチャーインサート (Becton, Dickinson and Company, Lincoln Park, NJ, USA) を用いた。線維芽細胞を 6-well プレートに 0.2×10^5 cells/well で播種し、表皮細胞はセルカルチャーインサートに 0.2×10^5 cells/well で播種し、培養を行った。線維芽細胞は 10% FBS を含む DMEM で、表皮細胞は HuMedia-KG2 で、37 °C、5% CO₂ 条件下でインキュベートした。

2-4. サンプル添加

HA および L-HA、HA4 は各々 0.1 $\mu\text{g/mL}$ の濃度のものを調製した。単層培養系では、線維芽細胞を 60 mm ディッシュに $0.3 - 0.5 \times 10^5$ cells/dish で播種し 1 日培養後、コントロールは培地のみ、HA および L-HA、HA4 は各々調製したサンプルを添加した。共培養系では、線維芽細胞 (プレート側) を 0.2×10^5 cells/well で、表皮細胞 (インサート側) を 0.2×10^5 cells/well で播種し 1 日培養した。ノーマルは単層培養系で線維芽細胞に培地のみ、コントロールおよび HA、HA4 は共培養系で表皮細胞 (インサート側) と線維芽細胞 (プレート側) に、培地または各々の条件で調製したサンプルを添加した。また、内因性ヒア

ルロン酸分解には、1 units/mL *Streptomyces hyalurolyticus* 由来ヒアルロニダーゼ (StrepH) を添加して 4 時間培養後、細胞を PBS で洗浄して各々調製したサンプルを添加した。

2-5. MTT 試験による細胞毒性の評価

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) を PBS で 5 mg/mL の濃度になるように調製し、ろ過滅菌をした。培地と MTT 溶液を 9 : 1 で混合し、細胞に添加して 3 時間、37 °C でインキュベートした。細胞を PBS で洗浄後、0.04 mol/L HCl/isopropyl alcohol を添加し、生成されたホルマザンを溶解した。マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2^e) (日本モレキュラーデバイス、東京、日本) で吸光度 (570 nm) を測定し、HA および HA4 による細胞毒性を評価した。

2-6. セルカウントによる細胞増殖の評価

細胞をトリプシンによりディッシュから剥がして回収後、培地に再懸濁した。細胞懸濁液をマイクロチューブに分取し、同量のトリパンブルー溶液と混合して血球計算板により細胞数をカウントした。全細胞数を算出し、HA および HA4 による細胞増殖を評価した。

2-7. RNA 抽出

培地を除き、細胞を PBS で洗浄した。RNAiso Plus を 1 mL 加え、ピペッティングをして細胞を壊し、マイクロチューブに移した。クロロホルムを 200 μ L 加えて攪拌し、室温で 2~3 分間放置した。12,000 \times g、4 °C で 15 分間遠心し、上層を別のチューブに取り、再びクロロホルムを 200 μ L 加えて攪拌し、12,000

× g、4 °C で 15 分間遠心した。上層を別のチューブに取り、冷イソプロパノールを 500 μL 加えて攪拌し、室温で 5~10 分間放置して、12,000 × g、4 °C で 10 分間遠心した。得られた RNA (沈殿物) に冷 70%エタノールを 500 μL 加えて軽く攪拌し、12,000 × g、4 °C で 15 分間遠心して RNA を洗浄した (この操作は 2 回行った)。エタノールを吸い取り、マイクロチューブのふたを開けて放置し、RNA が半透明になるまで乾燥させた。RNase free 水を 7 μL 加え、氷中で 15 分間放置した。軽く攪拌し、1 μL 取って RNase free 水で 100 倍に希釈し、マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e) で吸光度 (260 nm、280 nm) を測定して総 RNA 濃度を算出した。また、OD_{260/280} で DNA やタンパク質の混在、RNA の断片化が起こっていないかを確認した。

2-8. Real time PCR

PrimeScript[®] RT reagent Kit を使用して逆転写を行った。5×PrimScript[®] Buffer を 2.0 μL、PrimScript[®] RT Enzyme Mix を 0.5 μL、Oligo dT Primer を 0.5 μL、Random 6-mers を 0.5 μL で混合し、8 連チューブに 3.5 μL ずつ分注した。各々の RNase free 水に溶解した総 RNA がチューブ当り 0.5 μg となるように加え、RNase free 水が合計 6.5 μL となるように不足分の RNase free 水を加えた。軽く遠心を行い、泡を取り除いてサーマルサイクラー (Veriti) (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA) で逆転写反応を行った。

リアルタイム PCR は SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] を使用して行った。SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] (2×) を 10 μL、10 μM PCR Forward Primer (Table 5) を 0.4 μL、10 μM PCR Reverse Primer (Table 5) を 0.4 μL、ROX Reference Dye II (50×) を 0.4 μL、滅菌蒸留水を 6.8 μL で混合し、8 連チューブまたは 96 ウェルチューブに 18 μL ずつ分注し、希釈をした cDNA を 2 μL 加えて全量 20 μL と

した。軽く攪拌し、ABI PRISM[®] 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) でリアルタイム PCR を行った。

リアルタイム PCR は SYBR[®] Green I を用いた検出方法であるインターカレーション法を利用し、増幅する cDNA 量をリアルタイムに検出、測定した。また、評価は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いた相対定量で行った。

Table 5. Primer sequences

Primer		Sequence
GAPDH	Forward	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3'
	Reverse	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'
HAS1	Forward	5'-ACGTGCGGATCCTTAACCCT-3'
	Reverse	5'-AGGCCTAGAGGACCGCTGAT-3'
HAS2	Forward	5'-GTCATGGGCAGAGACAAATCAG-3'
	Reverse	5'-CGTTACGTGTTGCGAGCTTTC-3'
HAS3	Forward	5'-GGGCATTATCAAGGCCACCTA-3'
	Reverse	5'-CAGATTTGTTGATGGTAGCAATGG-3'

2-9. 細胞上清中ヒアルロン酸量の定量

培地中に生成されたヒアルロン酸量は、ELISA 法 (競合法) を利用したヒアルロン酸測定キット (測定範囲: 12.5 - 400 ng/mL) (生化学バイオビジネス) を使用して測定した。第 1 章の 2-7.と同様の方法で行い、検体にはセルスクレーパにより細胞を浮遊させた上清を用いた。

2-10. *In vivo*における皮膚サンプルの作成

第1章の2-8.と同様に Normal/UVA(-)および Control/UVA(+), HA/UVA(+), HA4/UVA(+) の4群に分け、各々の処理を行った。処理21日後に皮膚を剥離して8 mm 生検パンチにより皮膚サンプルを回収し、マイクロチューブに入れて-30 °C で凍結保存した。また、第1章の2-10.と同様に凍結切片を作成した。

2-11. 皮膚内ヒアルロン酸の抽出

凍結保存をしておいた皮膚サンプルに、メタノールを300 μ L 加え、眼科用ハサミで細かく刻んだ。20 分間超音波処理を行い、18,000 \times g で15 分間遠心し、上清を200 μ L 回収した。窒素気流下で乾固し、蒸留水を100 μ L 加えて残留物を溶解し、-30 °C で凍結保存した。

2-12. 皮膚内ヒアルロン酸量の定量

皮膚内ヒアルロン酸量は、ELISA 法（サンドイッチ法）を利用した Quantikine[®] Hyaluronan ELISA Kit（測定範囲：0.625 - 40 ng/mL）（R&D Systems）を用いて測定した。キット内のプレートを設定し、各ウェルに Assay Diluent RD1-14（タンパク質溶解緩衝液）を50 μ L 加えた。あらかじめ調製しておいたヒアルロン酸標準液（0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 ng/mL）および本章の2-11.で作成したサンプルを50 μ L 加え、室温で2時間振盪した。適応濃度に調製した Wash Buffer でウェル内を5回洗浄し、各ウェルに Hyaluronan Conjugate（HRP 標識ヒトアグリカン）を100 μ L 加え、室温で2時間振盪した。Wash Buffer でウェル内を5回洗浄し、Substrate Solution（Color Reagent A：Color Reagent B = 1：1）を100 μ L 加えて遮光し、室温で30分間静置した。Stop Solution を100 μ L 加え、マイクロプレートリーダーで吸光度（測定波長：

450 nm、対照波長：540 nm）を測定した。

2-13. HABP 染色

凍結切片はミクロトーム Leica CM 3050 S を使用し、6 μm の薄切切片を作成した。薄切切片は HABP 染色を行い、皮膚内のヒアルロン酸を観察した。

薄切切片をチャンバー内で PBS に浸けて 5 分間超音波処理を行い、余分な水分を拭き取り湿箱にセットした。中性ホルマリン溶液で調製した 0.5% 塩化セチルピリジニウムをスライドガラス状の薄切切片に滴下し、室温で 10 分間静置した。薄切切片を 20 mM Tris-HCl (pH 8) に 5 分間浸し、これを 3 回洗い洗浄した。余分な水分を拭き取って 20 mM Tris-HCl (pH 8) を滴下し、37 °C で 15 分間静置した。余分な水分を拭き取って 20 mM Tris-HCl (pH 8) で調製した 1 U/mL コンドロイチナーゼ ABC (avidin-biotin complex) を滴下し、37 °C で 2 時間静置した。室温で 5 分間、PBS で 3 回洗浄し、余分な水分を拭き取った。以下、洗浄は同様の操作を行った。アビジンを滴下し、室温で 20 分間静置した。洗浄後、ビオチンを滴下して室温で 20 分間静置した。洗浄後、0.3% H_2O_2 を滴下して室温で 20 分間静置した。洗浄後、1% BSA (bovine serum albumin) を滴下し、室温で 1 時間静置した。余分な水分を拭き取り、1% BSA で調製した 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HABP を滴下し、室温で 1 時間静置した。洗浄後、HRP-streptavidin を滴下して室温で 15 分間静置した。DAB (3, 3'-diaminobenzidine) を滴下し、顕微鏡で観察をしながら色の染まり具合を決め、染色後は直ぐに PBS で洗い流し、さらに洗浄を行った。細胞核を染色するために、チャンバー内でヘマトキシリン染色を行い、70、80、90、100% エタノールに順次浸け、3 回キシレンに浸けて透徹後、封入を行い顕微鏡で観察した。

2-14. データ解析

SAS 統計解析システム ver. 9.2 (SAS Institute) を使用し、 p 値を算出した。

統計解析法には、Tukey または Dunnett の多重検定を用いた。

第3節 結果

3-1. 線維芽細胞における HA および HA4 の細胞毒性と細胞増殖への影響

HA および HA4 の細胞毒性を調べるために、線維芽細胞に 0.1 $\mu\text{g/mL}$ HA、HA4 を添加し、24 時間後に MTT 試験を行った。その結果、HA、HA4 共に細胞毒性は認められなかった (Fig. 11a)。次に、細胞増殖への影響を調べるために、HA、HA4 添加 24 時間後、細胞を回収してセル数を算出した。その結果、HA、HA4 共に細胞増殖率は増加した (Fig. 11b)。

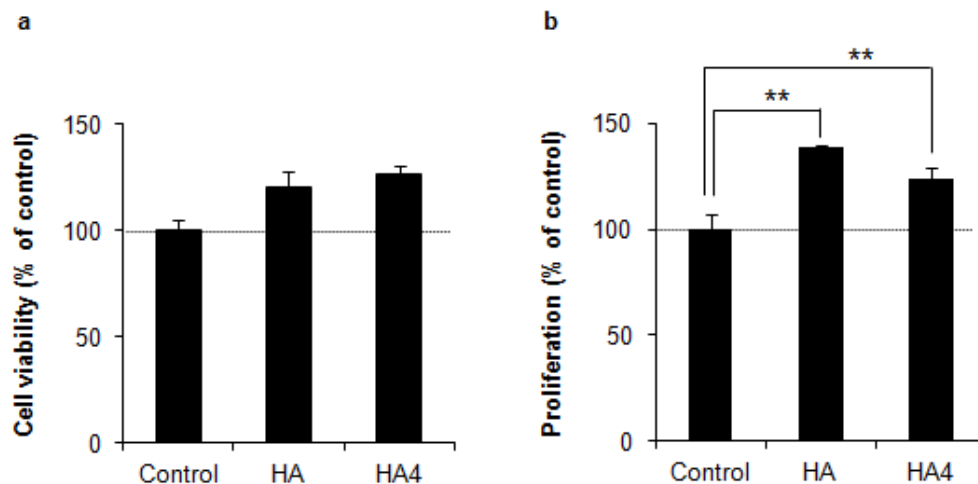


Fig. 11. Effect of HA and HA4 treatment on the cell viability and proliferation of fibroblasts. Cell viability was determined by the MTT assay, and proliferation was determined by cell count. Fibroblasts were treated for 24 h with 0.1 $\mu\text{g/mL}$ HA and HA4. Values were the mean \pm S.D. of three experiments. ** $p < 0.01$, Dunnett's *post-hoc* multiple comparison test.

3-2. 線維芽細胞における HA および HA4 添加による HAS 遺伝子発現量とヒアルロン酸生成量の比較

線維芽細胞にコントロールとして培地のみ、0.1 $\mu\text{g/mL}$ HA および HA4 を添加した。24 および 48 時間培養後、HAS1 - 3 遺伝子発現量を測定した。その結果、HA および HA4 を添加することで、HAS1 遺伝子発現量は 24 時間後で各々 1.7、1.6 倍、48 時間後で各々 3.4、2.0 倍と、経時的に増加した (Fig. 12)。次に、培地中に生成されたヒアルロン酸量を ELISA 法により測定した。その結果、ヒアルロン酸生成量に変化はみられなかった (Fig. 13)。

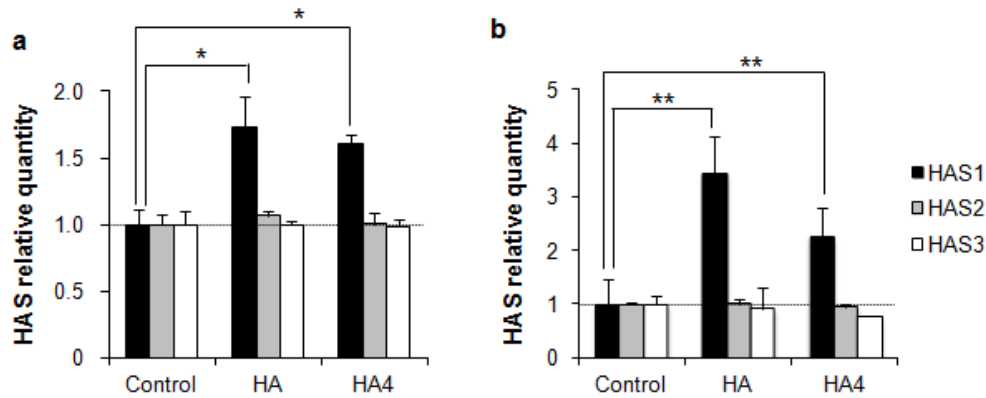


Fig. 12. Effects of HA and HA4 treatment for 24 and 48 h on HAS1, HAS2 and HAS3 mRNA expression in fibroblasts. HAS1, HAS2 and HAS3 mRNA expression was determined by quantitative real-time PCR. Fibroblasts were treated for 24 h (a) and 48 h (b) with 0.1 ug/mL HA and HA4. Values were normalized against GAPDH housekeeping gene levels and were compared with untreated controls. Values were means \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Tukey's *post-hoc* multiple comparison test.

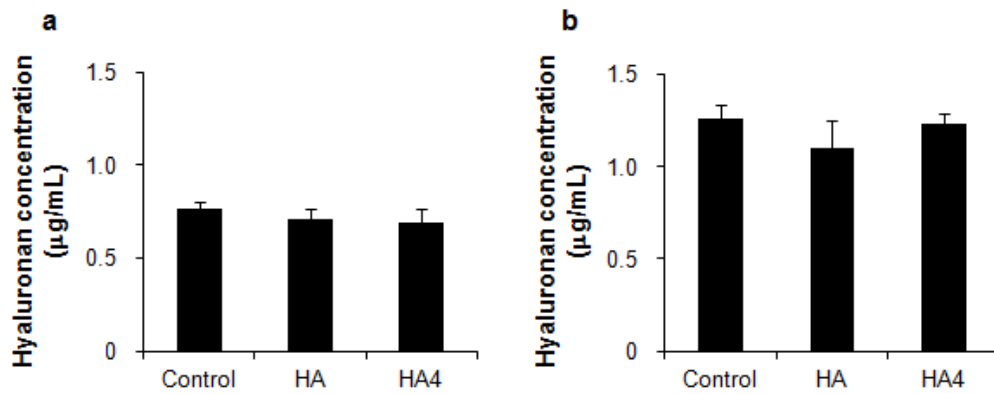


Fig. 13. Effects of HA and HA4 treatment for 24 and 48 h on hyaluronan contents in fibroblasts. Hyaluronan contents were determined by ELISA. Fibroblasts were treated for 24 h (a) and 48 h (b) with 0.1 ug/mL HA and HA4. Values were compared with untreated controls. Values were means \pm S.D. of three experiments.

3-3. 線維芽細胞-表皮細胞の共培養における HA および HA4 添加による HAS 遺伝子発現量とヒアルロン酸生成量の比較

細胞を用いてより皮膚に近い状態で評価を行うため、線維芽細胞と表皮細胞の共培養を行い、HAS1 - 3 遺伝子発現量およびヒアルロン酸生成量を比較した。単層培養した線維芽細胞に培地のみ添加したものをノーマル、線維芽細胞および表皮細胞の共培養に各々の培地のみ添加したものをコントロールとした。0.1 $\mu\text{g/mL}$ HA、HA4 は表皮細胞の上側のみに添加、または、線維芽細胞および表皮細胞の両側に添加した。その結果、表皮細胞のみに HA および HA4 を 24 時間添加することで、HAS1 遺伝子発現量が各々 6.6、5.0 倍増加した (Fig. 14a)。また、線維芽細胞および表皮細胞の両側に HA および HA4 を添加することで、HAS1 遺伝子発現量が各々 1.9、3.4 倍増加した (Fig. 14b)。次に、線維芽細胞側の培地中に生成されたヒアルロン酸量を ELISA 法により測定した。その結果、表皮細胞のみ、または、線維芽細胞および表皮細胞の両側に HA、HA4 を添加してもヒアルロン酸量に変化はみられなかった (Fig. 15)。

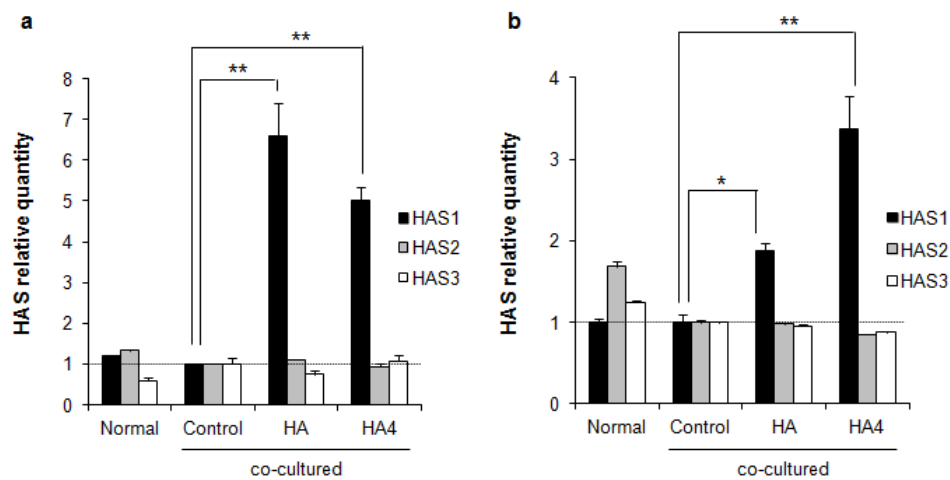


Fig. 14. Effect of HA and HA4 treatment for 24 h on the HAS1, HAS2 and HAS3 mRNA expression in co-culture of fibroblasts and keratinocytes. HAS1, HAS2 and HAS3 mRNA expressions were determined by quantitative real-time PCR. Keratinocytes (a) or both keratinocytes and fibroblasts (b) were treated with 0.1 $\mu\text{g/mL}$ HA and HA4 for 24 h. Values were normalized to GAPDH housekeeping gene levels and compared with untreated controls. Values were the mean \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Dunnett's *post-hoc* multiple comparison test.

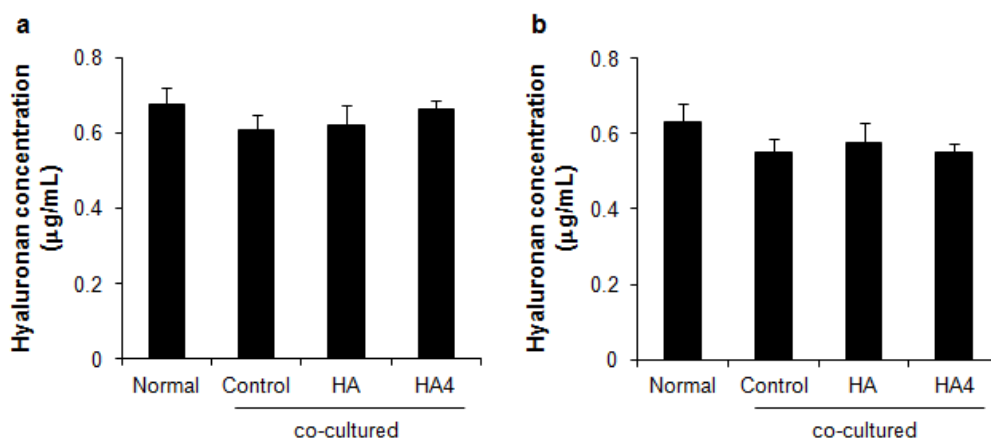


Fig. 15. Effect of HA and HA4 treatment for 24 h on the hyaluronan contents in co-culture of fibroblasts and keratinocytes. Hyaluronan contents were determined by ELISA. Keratinocytes (a) or both keratinocytes and fibroblasts (b) were treated with 0.1 $\mu\text{g/mL}$ HA and HA4 for 24 h. Values were compared with untreated controls. Values were the mean \pm S.D. of three experiments.

3-4. 線維芽細胞における L-HA 添加による HAS 遺伝子発現量とヒアルロン酸生成量の変化

低分子ヒアルロン酸はヒアルロン酸生成量を増加させることが知られていることから、次に、線維芽細胞における L-HA 添加での HAS 遺伝子発現およびヒアルロン酸生成量を、HA および HA4 と比較した。その結果、HA、L-HA、HA4 を添加することで HAS1 遺伝子発現量は各々1.6、1.6、1.7 倍増加した (Fig. 16a)。しかし、ヒアルロン酸生成量はコントロールと比較して HA および HA4 添加では変化はみられず、L-HA 添加により増加した (Fig. 16b)。

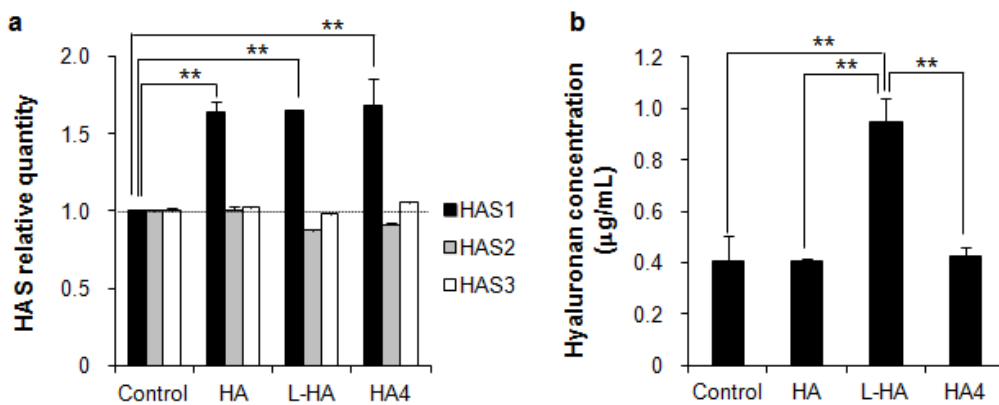


Fig. 16. Effects of HA, L-HA and HA4 treatment for 24 h on the HAS1, HAS2 and HAS3 mRNA expression and hyaluronan concentration in NHDFs. HAS1, HAS2 and HAS3 mRNA expression was determined by quantitative real-time PCR (a). Hyaluronan concentration were determined by ELISA (b). NHDFs were treated with 0.1 ug/mL HA, L-HA and HA4 for 24 h. Each value was compared with untreated controls. Values were means \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Tukey's *post-hoc* multiple comparison test.

3-5. HA および HA4 塗布における皮膚内ヒアルロン酸量の変化

HA および HA4 の *in vivo* におけるヒアルロン酸量を、UVA 照射ヘアレスマウスを用いて評価した。ヘアレスマウス背部皮膚に、UVA 照射および HA または HA4 塗布を 1 週間に 5 回、計 3 週間行った。その後、皮膚を摘出してヒアルロン酸を抽出し、皮膚中ヒアルロン酸量を ELISA で評価した。その結果、コントロールと比べて HA4 塗布により皮膚中ヒアルロン酸量は増加した (Fig. 17a)。また、皮膚切片を作成して HABP 染色を行い、皮膚内ヒアルロン酸を観察した。その結果、コントロールと比べて HA4 塗布で、ヒアルロン酸陽性部位の増加傾向が観察された (Fig. 17b and c)。

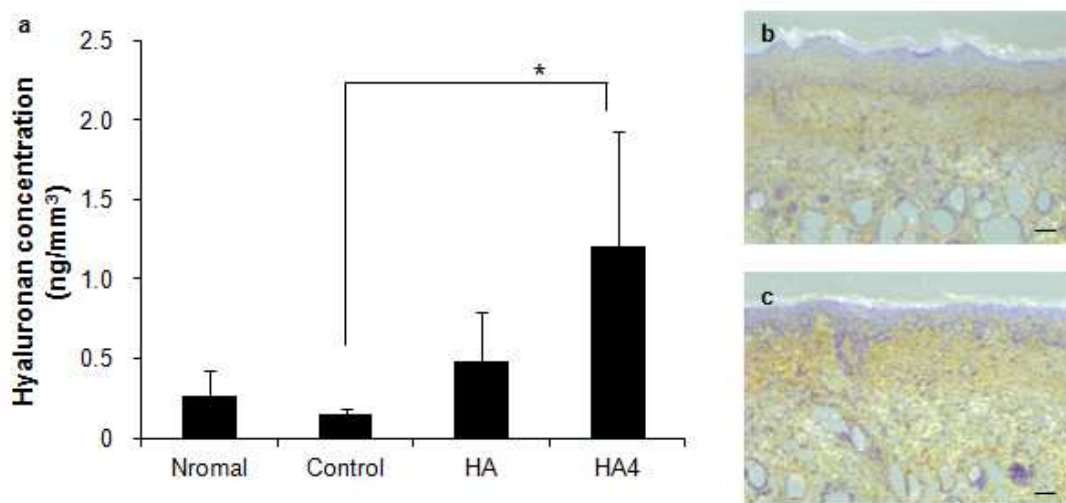


Fig. 17. Changes in hyaluronan content in skin after HA4 treatment. Hyaluronan was extracted for UVA-irradiated mice skin. Hyaluronan concentration was determined by ELISA (a). Skin samples were fixed and stained with HABP. UVA irradiated skin specimens of control (b) and HA4 (c) group after each sample treatment. Bar = 50 μ m. Values were the mean \pm S.D of three experiments. * $p < 0.05$, Dunnett's *post-hoc* multiple comparison test.

第4節 考察

本章では、HA4 による線維芽細胞のヒアルロン酸生成に及ぼす影響として、HA4 の HAS 遺伝子発現に及ぼす影響、および HA4 の *in vivo* 皮膚適用における皮膚内ヒアルロン酸量の変化を検討した。その結果、*in vitro* での線維芽細胞の単層培養および線維芽細胞と表皮細胞の共培養において、HAS1 遺伝子発現量が増加した。しかし、細胞上清中のヒアルロン酸量に変化は認められなかった。一方で、*in vivo* における皮膚内ヒアルロン酸量は、HA4 塗布によって増加した。

まず、線維芽細胞における HA および HA4 の、細胞毒性および細胞増殖への影響を調べた。その結果、0.1 $\mu\text{g/mL}$ HA および HA4 に細胞毒性はみられず、また、細胞増殖は促進した (Fig. 11)。ヒアルロン酸は細胞増殖を促進することが知られており、HA4 にもその作用があることが示された。この結果より、HA4 は 0.1 $\mu\text{g/mL}$ であれば細胞毒性がないと判断し、以下の研究に用いた。

線維芽細胞は、真皮でのヒアルロン酸生成を調節している。線維芽細胞の周囲に低分子ヒアルロン酸が増加することでヒアルロン酸生成が増加することから、HA4 添加によりヒアルロン酸生成が増加すると考えた。しかし、線維芽細胞に HA および HA4 を添加することで、HAS1 遺伝子発現量が増加したが (Fig. 12)、その増加に伴うヒアルロン酸生成への影響は認められなかった (Fig. 13)。

線維芽細胞と表皮細胞の共培養における HAS1 遺伝子発現量は、表皮細胞（インサート側）のみ、および表皮細胞（インサート側）および線維芽細胞（プレート側）に HA、HA4 を添加することで増加した (Fig. 14)。表皮細胞に EGF (epidermal growth factor) を添加することで、HAS 発現が増加することが報告されている⁵⁶⁾。このことから、単層培養系と比較して共培養系で HAS1 遺伝子発現量が増加したのは、線維芽細胞と表皮細胞を共培養することで表皮細胞か

ら増殖因子が発現し、線維芽細胞を刺激したことで HAS1 遺伝子発現量が増加したことが考えられる。また、ノーマル（単層培養）とコントロール（共培養）で HAS 遺伝子発現量にほとんど変化がみられないことから、表皮細胞を培養する際に放出されている可能性のある増殖因子による線維芽細胞での HAS 遺伝子発現に影響はないと考えた。このことから、HA および HA4 の刺激によって表皮細胞（インサート側）から増殖因子などが放出され、その増殖因子と HA または HA4 の両方が線維芽細胞（プレート側）を刺激したことで、線維芽細胞の単層培養系と比べて共培養系において HAS1 遺伝子発現量が増加したことが考えられる。また、共培養系において、表皮細胞（インサート側）のみに HA、HA4 を添加時（Fig. 14a）と比べて表皮細胞（インサート側）および線維芽細胞（プレート側）に HA、HA4 の添加時（Fig. 14b）で HAS1 遺伝子発現量の増加の割合が小さいのは、HA および HA4 濃度が濃くなったためだと考えている。その理由として、以前、線維芽細胞の単層培養で HA4 の濃度検討を行った際に濃度依存性は認められなかったが、濃度が濃くなると HAS 遺伝子発現量の増加の割合が小さくなったことから、共培養系でインサートメンブレンを HA、HA4 が通過し、結果的に HA、HA4 濃度が濃くなったことが考えられる。次に、表皮細胞と線維芽細胞の共培養系において、線維芽細胞の単層培養系よりも HAS1 遺伝子発現量が増加したため、線維芽細胞（プレート側）上清中のヒアルロン酸量を測定した。その結果、表皮細胞（インサート側）のみに HA、HA4 を添加したときも、表皮細胞（インサート側）および線維芽細胞（プレート側）に HA、HA4 を添加したときも、共に細胞上清中のヒアルロン酸量に変化は認められなかった（Fig. 15）。また、ヒアルロン酸に特異的であり、コンドロイチンおよびコンドロイチン硫酸に対しては活性を示さない StrepH によって内因性のヒアルロン酸を分解した後に HA、HA4 を添加しても、細胞上清中ヒアルロン酸量

に変化は認められなかった。さらに、HA、HA4 添加によって HAS1 遺伝子発現量が増加しているにもかかわらずヒアルロン酸生成量に影響がなかったことから、発現している遺伝子量ではヒアルロン酸生成に影響を及ぼさない可能性が考えられた。線維芽細胞には細胞周囲のヒアルロン酸の状況変化に反応して自らのヒアルロン酸生成量を制御する機構を有し、生体内で細胞周囲に低分子量のヒアルロン酸が増加するとヒアルロン酸生成が増加する。そこで、線維芽細胞の単層培養に L-HA を添加し HAS 遺伝子発現量を HA および HA4 と比較したところ、L-HA および HA、HA4 共に同程度の HAS1 遺伝子発現量が得られた (Fig. 16a)。しかし、HA および HA4 とは異なり、L-HA を添加したときにはヒアルロン酸生成量が増加した (Fig. 16b)。このことから、HA および HA4 添加による HAS1 遺伝子発現量は十分量であることが示された。本検討においてヒアルロン酸生成量に変化がみられなかったのは、HA の場合は負のフィードバックが働いたことでヒアルロン酸生成が抑えられたことが考えられる。しかし、HA4 による作用は不明である。

細胞実験での HA および HA4 添加によるヒアルロン酸生成への影響は認められなかった一方で、*in vivo* における UVA 照射ヘアレスマウスでの皮膚内ヒアルロン酸量は、HA4 塗布によって増加した (Fig. 17a)。第 1 章より、HA4 は受動拡散で皮膚を透過し、UVA 照射ヘアレスマウス皮膚に HA4 を塗布することで皮膚機能が改善することを明らかにしている。このことから、UVA 照射ヘアレスマウス皮膚に HA4 を塗布することで皮膚内へ HA4 が浸透し、細胞に作用してヒアルロン酸合成能が上昇したことが考えられる。いくつかの成長因子やサイトカインが、各々の細胞膜受容体を介して HAS アイソザイムの発現を制御していることが報告されている⁵⁷⁻⁶²⁾。また、ヒアルロン酸が認識する受容体の中には、HA4 は結合できない受容体が存在する。*In vitro* 細胞実験では変化は

なかったが、*in vivo* 動物実験でヒアルロン酸量が増加したのは、表皮細胞や線維芽細胞またはそれ以外の細胞や組織から発現する、または皮膚内に存在する何らかの物質が関与して、HA4 の刺激を補助または増強している可能性が考えられる。この何らかの物質は結合タンパク質で、HA4 が結合できない受容体に結合することを補助しているかもしれない。この何らかの物質は、HA4 の刺激を増強しているかもしれない。

In vitro 細胞実験では変化はなかったが、*in vivo* 動物実験でヒアルロン酸量が増加していた詳細なメカニズムは不明である。しかし第 2 章より、HA4 を塗布することで、非侵襲的に皮膚内ではヒアルロン酸量を増加させることができることが示された。現在、美容分野や医療において、ヒアルロン酸注入療法が盛んに行われている。美容分野では、シワや瘢痕の治療に用いられ、医療では関節リウマチなどの治療に用いられている。このことから、HA4 を皮膚適用することで、シワや関節痛の予防に役立つかもしれない。今後、HA4 による皮膚内ヒアルロン酸量の増加メカニズムの解明を期待する。

第3章 HA4による表皮細胞の分化に及ぼす影響

第1節 緒論

表皮を構成する細胞の約 95%は表皮細胞であり、表皮は深部から基底層、有棘層、顆粒層、角層に分類される。皮膚の最外層に位置する角層は生体と環境の境界にあり、生体内からの水分損失を抑え、また、外部からの異物に対する防御を行う。表皮では幹細胞が分裂して生まれた娘細胞が、表皮層を上へ移動し、脱核により角層となる。角層は 15~20 層存在し、約一日で一枚表面から剥がれ落ちる。この過程を分化と呼び、基底層から顆粒層までを約 14 日間、角層で脱落するまで約 14 日間かかるといわれている。通常の哺乳類の表皮は、細胞分裂と基底層でのケラチン K5/K14、続いて K1/K10、ケラチンを束ねるフィラグリン、そしてインボルクリンやロリクリンがトランスグルタミナーゼなどによって変換され、コーニファイドエンベロープが発現する^{63, 64)}。哺乳類の表皮細胞の最終分化では、コーニファイドエンベロープに取り巻かれるクロスリンクしたケラチンタンパク質と死んだ細胞を多く含む角層形態になる。分化の過程で、フィラグリンは有棘層上層から発現する⁶⁵⁾。フィラグリンの前駆体であるプロフィラグリンは、顆粒層から角層に分化する過程でプロテアーゼによりフィラグリンを遊離し、Calpain I や Caspase14 などによって断片化される。この断片化フィラグリンは、ブレオマイシン水解酵素によって水分保持機能の高いアミノ酸 (NMF) を遊離する^{66, 67)}。インボルクリンはコーニファイドエンベロープを形成する前駆タンパク質として、有棘層から顆粒層で発現する^{68, 69)}。インボルクリンはトランスグルタミナーゼによりコーニファイドエンベロープに組み込まれ、セラミドなどの細胞間脂質と結合して皮膚バリア機能を形成する⁷⁰⁻⁷²⁾。トランスグルタミナーゼは主にタンパク質とタンパク質をつなぐ架橋

活性を持ち、皮膚表面の物理的強度を強める役割を担っている^{73, 74)} (Fig. 18)。

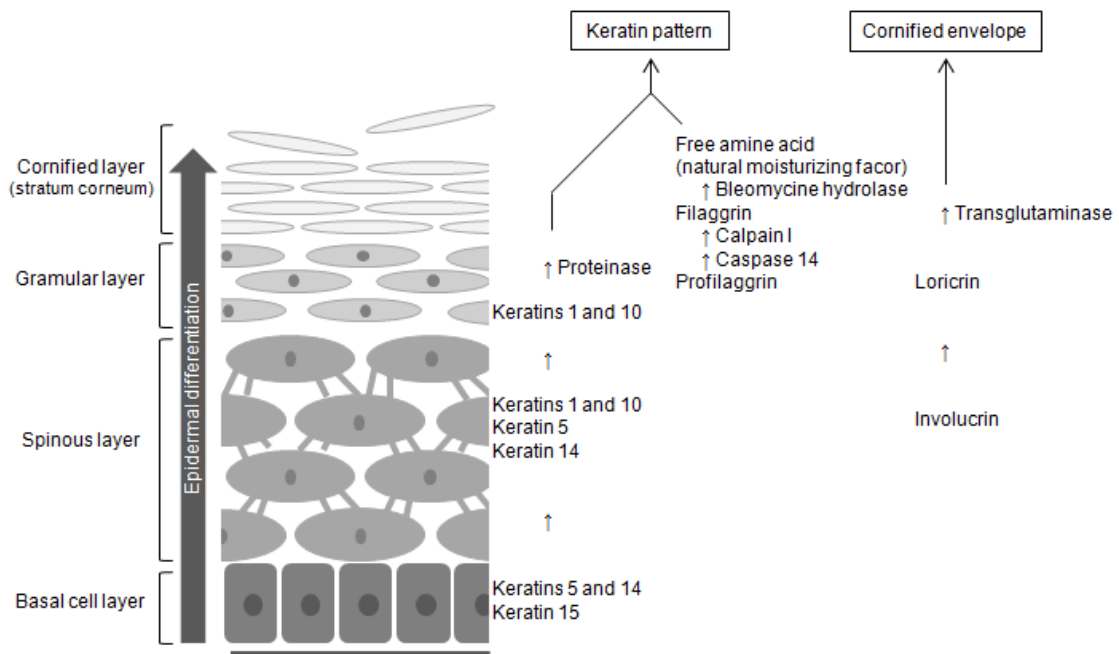


Fig. 18. Epidermal differentiation. The epidermis is the outermost layer of the skin and is separated from the underlying dermis by the basement membrane. Keratinocytes, which compose the epidermis, proliferate within the basal cell layer. As differentiation proceeds, keratinocytes progress upwards through the different epidermal layers (the spinous layer, granular layer and cornified layer or stratum corneum), becoming anucleated and increasingly compacted in size, before being eventually lost from the skin surface by desquamation (shedding of the outer layers of skin). Each stage of epidermal differentiation is characterised by the expression of specific proteins, and examples of these are listed on the figure.

CD44 はヒアルロン酸受容体や、細胞 - 細胞、細胞 - 細胞間基質（ヒアルロン酸やコラーゲンなど）を接着させる接着分子のひとつである。細胞凝集、細胞外マトリックスの保持、受容体を介したヒアルロン酸の取り込み・分解、そしてマトリックス - 細胞間のシグナル伝達などに関与する。さらに、腫瘍転移や創傷

治癒、炎症部位での白血球の血管外遊出を含む様々な生理的、そして病態生理的に重要である⁷⁵⁾。また、CD44 は最も知られているヒアルロン酸受容体でもある⁷⁶⁾。ヒアルロン酸と CD44 の結合能力は常に調節されており、CD44 は結合していない不活性型やリガンドに結合した活性型で存在する。ヒアルロン酸の生体に及ぼす様々な効果は、分子サイズや CD44 といった受容体などの様々な要因に依存して複雑に変化する。ヒアルロン酸と CD44 の相互作用により、正常角層構造や表皮バリア機能に必要な表皮細胞分化やコレステロール合成、ラメラ形成に関与することが報告されている^{77, 78)}。培養細胞では、CD44 は細胞質尾部でセリン/スレオニン残基が構造的にリン酸化される⁷⁹⁻⁸¹⁾。また、ヒアルロン酸と CD44 の相互作用は、PKN γ キナーゼ活性依存的 Rac1 が PLC γ 1 リン酸化やコルタクチンのリン酸化に働き、細胞接着や分化といった表皮細胞機能に必須である PLC γ 1 介在 IP₃ 産生や細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇につながる⁷⁸⁾ (Fig. 19)。このように、ヒアルロン酸と CD44 の相互作用により、様々なシグナルが働くことが近年明らかとなってきた。

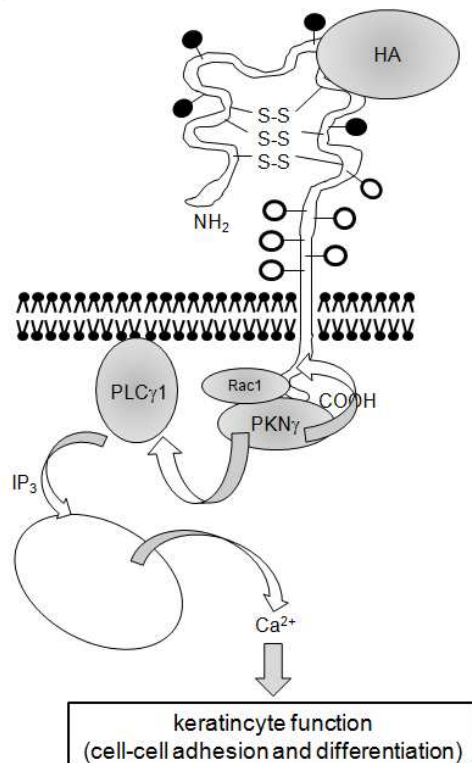


Fig. 19. A proposed model for the interaction between hyaluronan/CD44 mediated Rac1·PKN γ activation and PLC γ 1 regulated Ca²⁺ signaling during keratinocyte cell-cell adhesion and differentiation. Hyaluronan-CD44 interaction with Rac1 dependent PKN γ kinase activation promotes phosphorylation of PLC γ 1 phosphorylation, leading to the onset of PLC γ 1-mediated IP₃ production/Ca²⁺ signaling required for keratinocyte function.

そこで本章では、HA4 の表皮細胞の分化に及ぼす影響を調査し、分化を誘導することが報告されている高分子ヒアルロン酸と比較した。また、CD44 遺伝子発現量および CD44 のリン酸化タンパク質量、細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定し、HA4 による細胞内シグナルについて評価した。

第 2 節 実験方法

2-1. 実験材料

HA4は糖質科学研究所（東京、日本）より、HAは資生堂リサーチセンター（横浜、神奈川、日本）より供与された。その他は、第 2 章と同様の試薬を用いた。

2-2. 使用細胞

腹部由来正常ヒト皮膚表皮細胞は Biopredic (Rennes, France) より成人女性のものを、株式会社ケー・エー・シー（大阪、日本）経由で購入した。

2-3. 細胞培養

表皮細胞は 100 mm ディッシュに 2×10^5 cells/dish で播種し、培養を行った。表皮細胞は HuMedia-KG2 で、37 °C、5% CO₂ 条件下でインキュベートした。

2-4. サンプル添加

HA および HA4 は各々 1 µg/mL の濃度のものを調製した。表皮細胞を 60 mm ディッシュに 2×10^5 cells/dish で播種し 1 日培養後、コントロールは培地のみ、HA または HA4 は各々調製したサンプルを添加した。なお、サンプル添加は、適用期間中毎日行った。

2-5. MTT 試験による細胞毒性の評価

第 2 章の 2-5.と同様の方法で行った。

2-6. セルカウントによる細胞増殖の評価

第 2 章の 2-6.と同様の方法で行った。

2-7. RNA 抽出

第 2 章の 2-7.と同様の方法で行った。

2-8. Real time PCR

第 2 章の 2-8.と同様の方法で行った。プライマーは、以下の配列のものを使用した (Table 6)。

Table 6. Primer sequences

Primer		Sequence
GAPDH	Forward	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3'
	Reverse	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'
Keratin 5 (K5)	Forward	5'-GAGCTGAGAAACATGCAGGA-3'
	Reverse	5'-TCTCAGCAGTGGTACGCTTG-3'
Keratin 10 (K10)	Forward	5'-CCATCGATGACCTTAAAAATCAG-3'
	Reverse	5'-GCAGAGCTACCTCATTCTCATACTT-3'
Involucrin	Forward	5'-TGCCTGAGCAAGAATGTGAG-3'
	Reverse	5'-TTCCTCATGCTGTTCCCAGT-3'
Profilaggrin	Forward	5'-CCATCATGGATCTGCGTGG-3'
	Reverse	5'-CACGAGAGGAAGTCTCTGCGT-3'
Transglutaminase (TGase)	Forward	5'-TCTTCAAGAACCCCTTCCC-3'
	Reverse	5'-TCTGTAACCCAGAGCCTTCGA-3'
CD44	Forward	5'-GACACCATGGACAAGTTTTGG-3'
	Reverse	5'-CGGCAGGTTATATTCAAATCG-3'

2-9. タンパク質抽出

ディッシュから培地を除き、細胞を PBS で洗浄した。細胞溶解液 (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2% w/v SDS、10% glycerol) を 1 mL、10 mM オルトバナジン酸ナトリウムを 100 μ L、10 mM ベンジルスホニルフルオリドを 100 μ L 添加し、セルスクレーパを用いて細胞を破壊してマイクロチューブに回収した。15,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心して上清を回収し、100 μ L ずつ分注をして -80 $^{\circ}$ C で保存した。また、タンパク質濃度は Lowry 法⁸²⁾により測定し、算出した。

2-10. ゲルの作成

ゲル板を組立て、10% 分離ゲル (精製水 9.13 mL、30% アクリルアミド/ビズ 7.6 mL、1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 5.7 mL、10% SDS 227 μ L、10% ペルオキシ二硫酸アンモニウム (ammonium peroxodisulfate, APS) 76 μ L、*N,N,N,N'*-テトラメチルエチレンジアミン (tetramethylethylenediamine、TEMED) 11.3 μ L) を流し入れ、その上に水飽和 1-ブタノールを乗せて約 1 時間静置し、ゲルを固めた。精製水で水飽和 1-ブタノールを洗い流し、余分な水分を拭き取った。濃縮ゲル (精製水 3.85 mL、30% アクリルアミド/ビズ 1.1 mL、0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 1.7 mL、10% SDS 67 μ L、10% APS 22.7 μ L、TEMED 6.7 μ L) を流し入れ、コームを挿入して約 40 分間静置し、ゲルを固めた。

2-11. 泳動サンプルの調製

本章の 2-9.で抽出したタンパク質を、全て同じ濃度になるように精製水で調製した。必要量のサンプルバッファー (精製水 3.55 mL、0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、グリセロール 2.5 mL、10% SDS 2.0 mL、0.5% ブロモフェノールブルー 0.2 mL) に β -メルカプトエタノールを 1/20 量加え、タンパク質溶液に同量 (1 :

1) 加えた。95 °C で 4 分間加熱し、これをサンプルとした。

2-12. Western blotting

ゲル板を電極アッセンブリに装着し、泳動槽にセットした。U 字ガasket 内を泳動バッファー (Tris 3.03 g、グリシン 14.4 g、1 g SDS を、精製水で全量 1 L に調製) で満たして気泡を除き、泳動槽の規定の位置まで泳動バッファーを入れた。泳動槽を電源 (パワーパック HC) (BioRad、Hercules、CA、USA) に繋ぎ、200 V、3.00 A、300 W の条件で泳動を行った。Criterion トランスブロットセルのタンクに転写バッファー (Tris 3.0 g、グリシン 14.4 g、メタノール 150 mL を、精製水で全量 1 L に調製) を半分入れ、アイスブロックをセットした。セルセッティングブロックでゲルおよび親水化処理を行った PVDF (polyvinylidene difluoride) メンブレンをセットし、トランスブロットセルにはめた。転写バッファーを規定の位置まで入れ、100 V、3.00 A、300 W の条件で 30 分間転写を行った。転写後、パラフィルムで作成した舟にメンブレンの表を上側にしてセットした。TBS-T (TBS (1 M Tris-HCl 20 mL、塩化ナトリウム 8 g を精製水に溶解し、pH 7.6 に調製後に全量 1 L に調製) 1 L、Tween 20 1 g) で調製したブロッキングバッファー (5% スキムミルク) を入れてメンブレンを浸し、4 °C でオーバーナイトまたは室温で 1 時間振盪した。メンブレンを TBS-T ですすぎ、TBS-T に浸して振盪した (5 分 × 2、10 分 × 1)。TBS-T で調製した 5% スキムミルクで各種一次抗体 (Table 7) を希釈し、メンブレンを浸して 1 時間室温で振盪した。メンブレンを TBS-T ですすぎ、TBS-T に浸して振盪した (5 分 × 2、10 分 × 1)。TBS-T で調製した 5% スキムミルクで各々由来の各種二次抗体を希釈し、メンブレンを浸して 1 時間室温で振盪した。メンブレンを TBS-T ですすぎ、TBS-T に浸して振盪した (5 分 × 2、10 分 × 1)。ラップ上に

ブロット面が上になるようにメンブレンを置き、全体を覆うように検出試薬 (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, Bio-Rad) を添加し、室温で 5 分間静置した。ルミノイメーリアナライザーシステム (LAS-1000) (富士フィルム) を使用してタンパク質のバンドを検出し、定量を行った。

Table 7. Antibody

Antibody	Isotype	Molecular weight
Keratin 10 (K10)	Rabbit	57 kDa
Involucrin	Rabbit	69 kDa
Filaggrin	Rabbit	40 kDa
CD44	Rabbit	43-48 kDa
Phospho-CD44 (pCD44)	Rabbit	85 kDa
β -Actin	Rabbit	45 kDa

2-13. 細胞内カルシウム濃度測定

細胞内カルシウム濃度の測定には、Calcium Kit II-Fura 2 (同仁化学研究所、上益城、熊本、日本) を使用した。96 ウェルプレートに 1.5×10^4 cells/well で播種し 1 日培養後、HA および HA4 を 100 μ L 添加した。前準備で、Fura 2-AM 50 μ g に Dimethylsulfoxide 50 μ L 加え、溶解した。Quenching Buffer 5 mL に、Hank's HEPES Buffer (10 \times) 500 μ L、5% Pluronic[®] F-127 160 μ L (最終濃度 0.04%)、250 mM Probenecid 100 μ L (最終濃度 1.25 mM) を添加し、全量が 10 mL となるように精製水を加えて混合した。これに Fura 2-AM の Dimethylsulfoxide 50 μ L を添加して混合溶解し、Loading Buffer とした。培地

は取り除かず、各ウェルに調製した Loading Buffer を 100 μL 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートした。マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2[®]) で吸光度 ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm} / 380 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$) を測定し、HA および HA4 による細胞内カルシウム濃度変化を評価した。Fura2-AM は細胞内に取り込まれると、酵素反応により Fura2 が生成される。Fura2 は細胞内でカルシウムイオンと錯体を形成し、その錯体を測定することで細胞内カルシウム濃度を相対的に定量する (Fig. 20)。

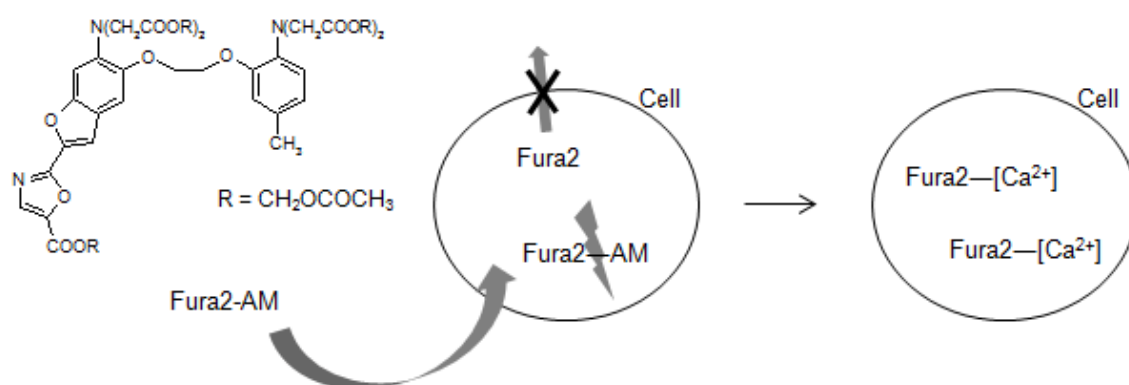


Fig. 20. Measurement principle of intracellular calcium concentration

2-14. データ解析

SAS 統計解析システム ver. 9.2 (SAS Institute) を使用し、 p 値を算出した。統計解析法には、Tukey の多重検定を用いた。

第3節 結果

3-1. 表皮細胞における HA および HA4 の細胞毒性と細胞増殖への影響

HA および HA4 の細胞毒性を調べるために、表皮細胞に 1 $\mu\text{g/mL}$ HA、HA4 を添加 24 時間後に、MTT 試験を行った。その結果、HA、HA4 共に細胞毒性は認められなかった (Fig. 21)。次に、細胞増殖への影響を調べるために、HA、HA4 添加 24 時間および 48 時間後、細胞を回収してセルカウントを行った。その結果、24 時間後では細胞数に変化はみられなかったが、48 時間後では、HA および HA4 添加により細胞数が減少した (Fig. 22)。

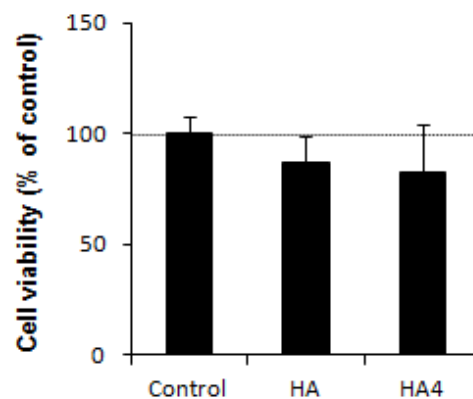


Fig. 21. Effect of HA and HA4 treatment on the cell viability of keratinocytes. Cell viability was determined by the MTT assay. Keratinocytes were treated for 24 h with 1 $\mu\text{g/mL}$ HA and HA4. Values were the mean \pm S.D. of three experiments.

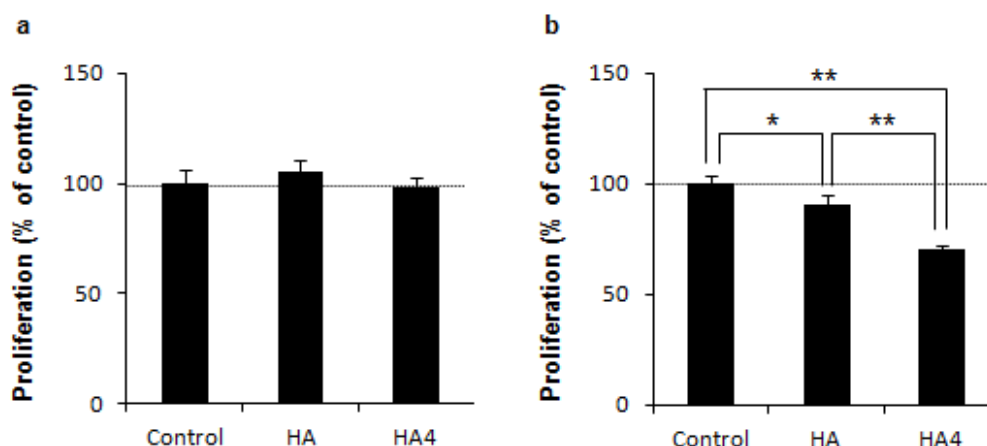


Fig. 22. Effect of HA and HA4 treatment on the cell proliferation of keratinocytes. Proliferation was determined by cell count. Keratinocytes were treated for 24 h (a) and 48 h (b) with 1 $\mu\text{g/mL}$ HA and HA4. Values were the mean \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Tukey's *post-hoc* multiple comparison test.

3-2. 表皮細胞における HA および HA4 添加による分化マーカー遺伝子発現量の比較

表皮細胞にコントロールとして培地のみ、1 $\mu\text{g/mL}$ HA および HA4 を添加した。4、8、24、72、216 時間培養後、K5 および K10、インボルクリン、プロフィラグリン、トランスグルタミナーゼ遺伝子発現量を測定した。その結果、HA および HA4 添加により、各々の分化マーカー遺伝子発現量は時間経過と共に増加した。HA および HA4 添加 4、8、24 時間後、各分化マーカー遺伝子発現量に変化はみられなかった。添加 72 時間 (3 日) 後、HA4 を添加することでインボルクリンおよびプロフィラグリン、トランスグルタミナーゼ遺伝子発現量は、コントロールと比較して各々 1.3、1.3、1.5 倍増加した (Fig. 23)。添加 216 時間 (9 日) 後、HA および HA4 を添加することで、共に各分化マーカー遺伝子発現量は増加した。特に、後期分化マーカーであるインボルクリンおよびプロフィラグリン、トランスグルタミナーゼ遺伝子発現量は有意に増加した。

HA 添加によるインボルクリンおよびプロフィラグリン、トランスグルタミナーゼ遺伝子発現量は、コントロールと比較して各々1.2、1.6、1.6 倍増加した。HA4 添加によるインボルクリンおよびプロフィラグリン、トランスグルタミナーゼ遺伝子発現量は、コントロールと比較して各々1.3、1.5、1.6 倍増加した (Fig. 24)。

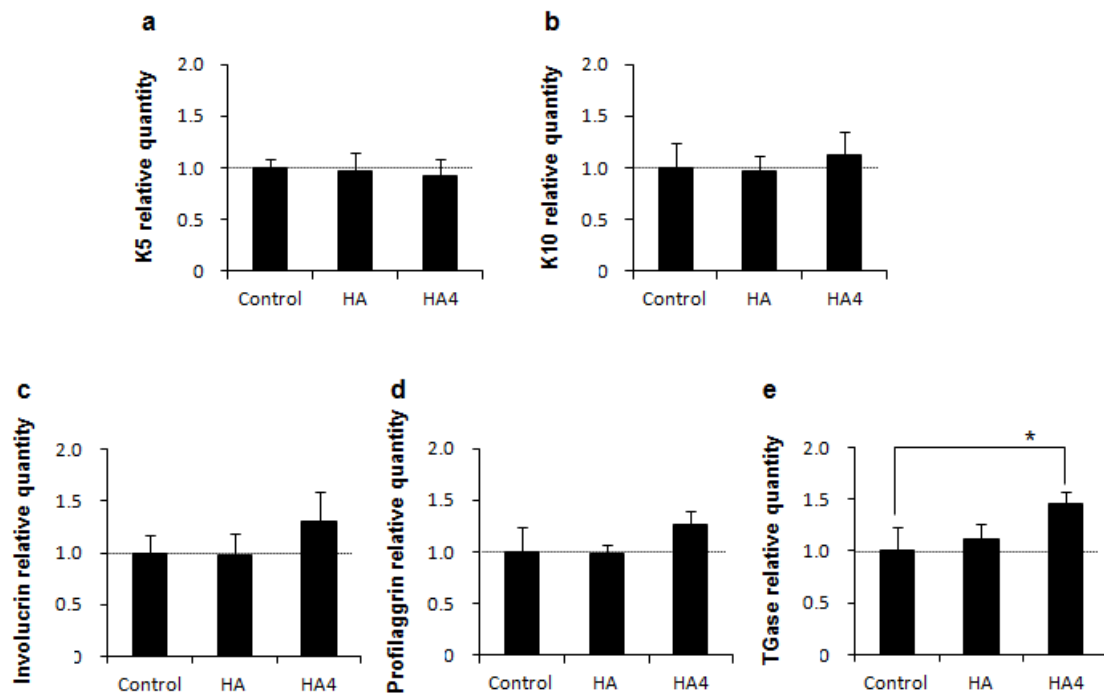


Fig. 23. Effect of HA and HA4 treatment for 3 days on each differentiation marker mRNA expression in keratinocytes. K5 (a), K10 (b), involucrin (c), profilaggrin (d), and TGase (e) mRNA expressions were determined by quantitative real-time PCR. Keratinocytes were treated with 1 μ g/mL HA and HA4 for 3 days. Values were normalized to GAPDH housekeeping gene levels and compared with untreated controls. Values were the mean \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, Tukey's *post-hoc* multiple comparison test.

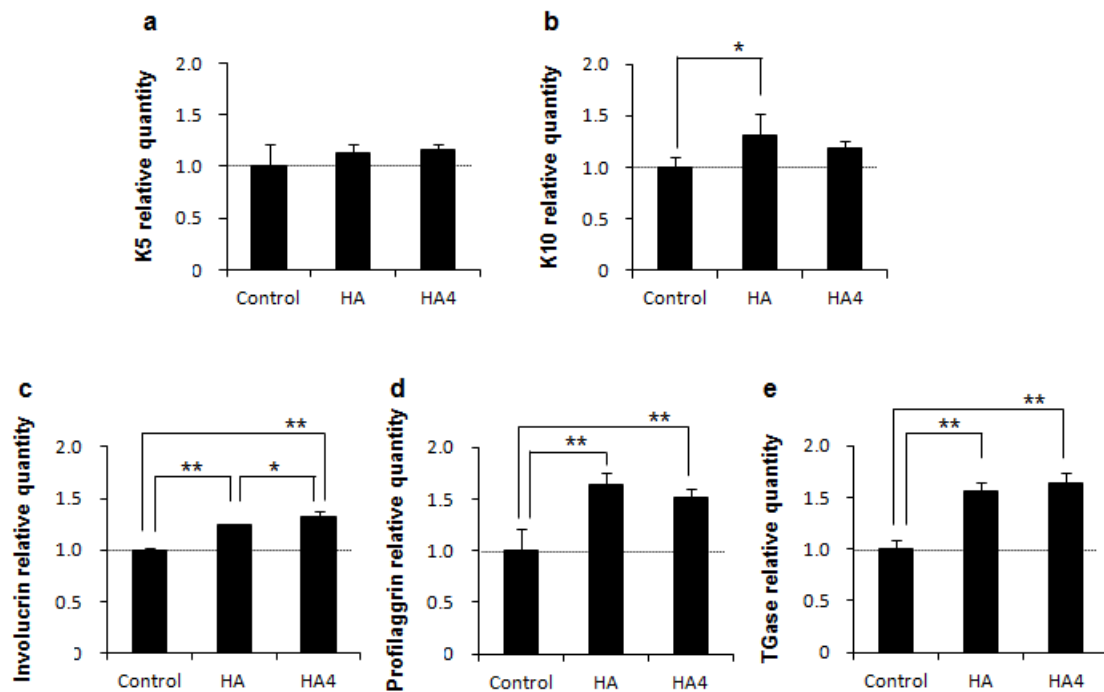


Fig. 24. Effect of HA and HA4 treatment for 9 days on each differentiation marker mRNA expression in keratinocytes. K5 (a), K10 (b), involucrin (c), profilaggrin (d), and TGase (e) mRNA expressions were determined by quantitative real-time PCR. Keratinocytes were treated with 1 $\mu\text{g/mL}$ HA and HA4 for 9 days. Values were normalized to GAPDH housekeeping gene levels and compared with untreated controls. Values were the mean \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Tukey's *post-hoc* multiple comparison test.

3-3. 表皮細胞における HA および HA4 添加による分化マーカータンパク質量の比較

表皮細胞にコントロールとして培地のみ、1 $\mu\text{g/mL}$ HA および HA4 を添加した。72、216 時間培養後、K10 およびインボルクリン、フィラグリンタンパク質量を測定した。その結果、添加 72 時間（3 日）後、HA、HA4 を添加することで K10 タンパク質量は、コントロールと比較して各々 1.2、2.2 倍増加した（Fig. 25）。後期分化マーカーのインボルクリンおよびフィラグリンタンパク質は発現していなかった。添加 216 時間（9 日）後、HA および HA4 を添加することで、共に各分化マーカータンパク質量は増加した。HA 添加によるインボルクリンおよびフィラグリンタンパク質量は、コントロールと比較して各々 1.4、1.4 倍増加した。HA4 添加によるインボルクリンおよびフィラグリンタンパク質量は、コントロールと比較して各々 2.0、1.2 倍増加した（Fig. 26）。

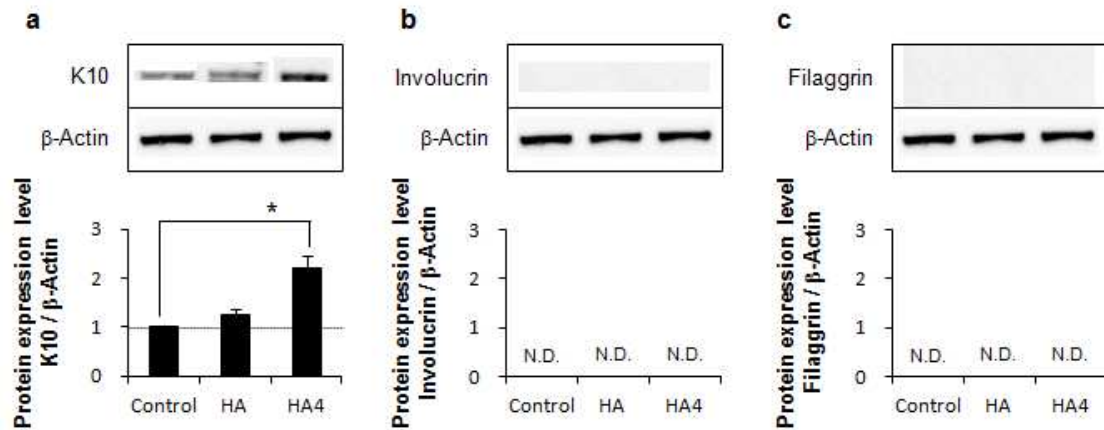


Fig. 25. Effect of HA and HA4 treatment for 3 days on each differentiation marker protein evaluation in keratinocytes. K10 (a), involucrin (b), and filaggrin (c) proteins were determined by western blotting. Keratinocytes were treated with 1 μ g/mL HA and HA4 for 3 days. Values were normalized to β -actin housekeeping protein levels and compared with untreated controls. Values were the mean \pm S.D. of three experiments. N.D., not determined. * $p < 0.05$, Tukey's *post-hoc* multiple comparison test.

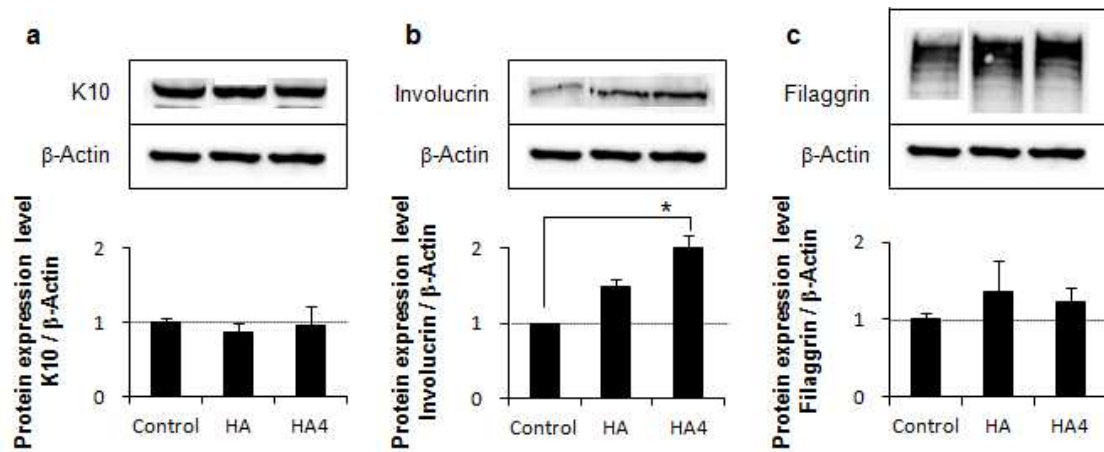


Fig. 26. Effect of HA and HA4 treatment for 9 days on each differentiation markers protein evaluation in keratinocytes. K10 (a), involucrin (b) and filaggrin (c) protein were determined by western blotting. Keratinocytes were treated with 1 μ g/mL HA and HA4 for 9 days. Values were normalized to the β -actin housekeeping protein levels and compared with untreated control. Values were the mean \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, Tukey's *post-hoc* multiple comparison test.

3-4. 表皮細胞における HA および HA4 添加による CD44 遺伝子発現量の比較

表皮細胞にコントロールとして培地のみ、1 $\mu\text{g/mL}$ HA および HA4 を添加した。4、8、24、216 時間培養後、CD44 遺伝子発現量を測定した。その結果、HA4 添加で CD44 遺伝子発現量が増加した。特に、添加 216 時間（9 日）後にはコントロールと比べて CD44 遺伝子発現量は 1.5 倍増加した（Fig. 27）。

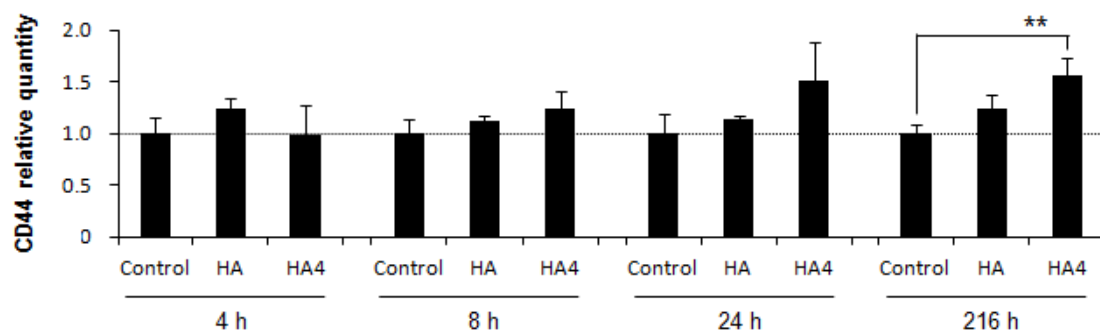


Fig. 27. Effect of HA and HA4 on the CD44 mRNA expression in keratinocytes. CD44 mRNA expression was determined by quantitative real-time PCR. Keratinocytes were treated with 1 $\mu\text{g/mL}$ HA and HA4 for 4 h, 8 h, 24 h, and 216 h (9 days). Values were normalized to GAPDH housekeeping gene levels and compared with untreated controls. Values were the mean \pm S.D. of three experiments. ** $p < 0.01$, Tukey's *post-hoc* multiple comparison test.

3-5. 表皮細胞における HA および HA4 添加による CD44 およびリン酸化 CD44 タンパク質量の比較

表皮細胞にコントロールとして培地のみ、1 $\mu\text{g/mL}$ HA および HA4 を添加し 8 時間培養後、CD44 およびリン酸化 CD44 タンパク質量を測定した。その結果、HA、HA4 共に CD44 タンパク質量およびリン酸化 CD44 タンパク質量は増加し、特に HA4 添加により有意に増加した (Fig. 28)。

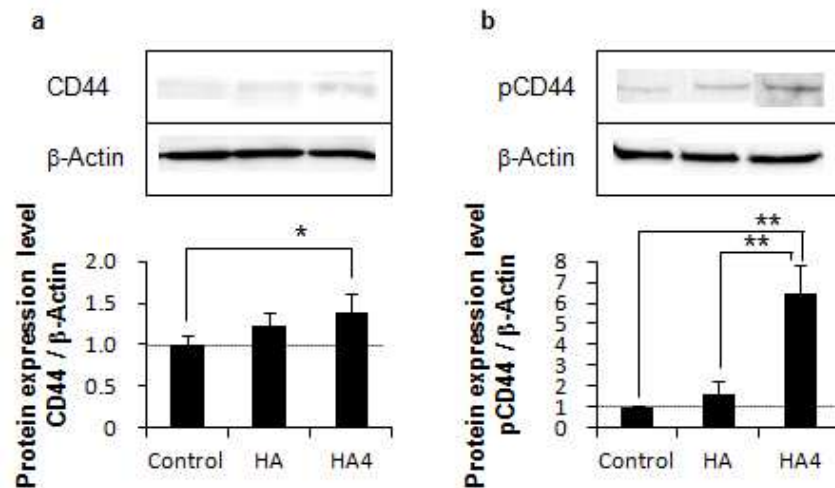


Fig. 28. Effect of HA and HA4 on the CD44 and CD44-phosphorylated protein evaluation in keratinocytes. CD44 (a) and CD44-phosphorylated (b) protein were determined by western blotting. Keratinocytes were treated with 1 $\mu\text{g/mL}$ HA and HA4 for 8 h. Values were normalized to β -actin housekeeping protein levels and compared with untreated controls. Values were the mean \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Tukey's *post-hoc* multiple comparison test.

3-6. 表皮細胞における HA および HA4 添加による細胞内カルシウム濃度の変化

表皮細胞にコントロールとして培地のみ、1 $\mu\text{g/mL}$ HA および HA4 を添加した。1、4、6、8、12 時間培養後、細胞内カルシウム濃度を測定した。その結果、添加 4 時間後ではコントロールおよび HA と比べて、HA4 添加により、細胞内カルシウム濃度は有意に増加した (Fig. 29)。

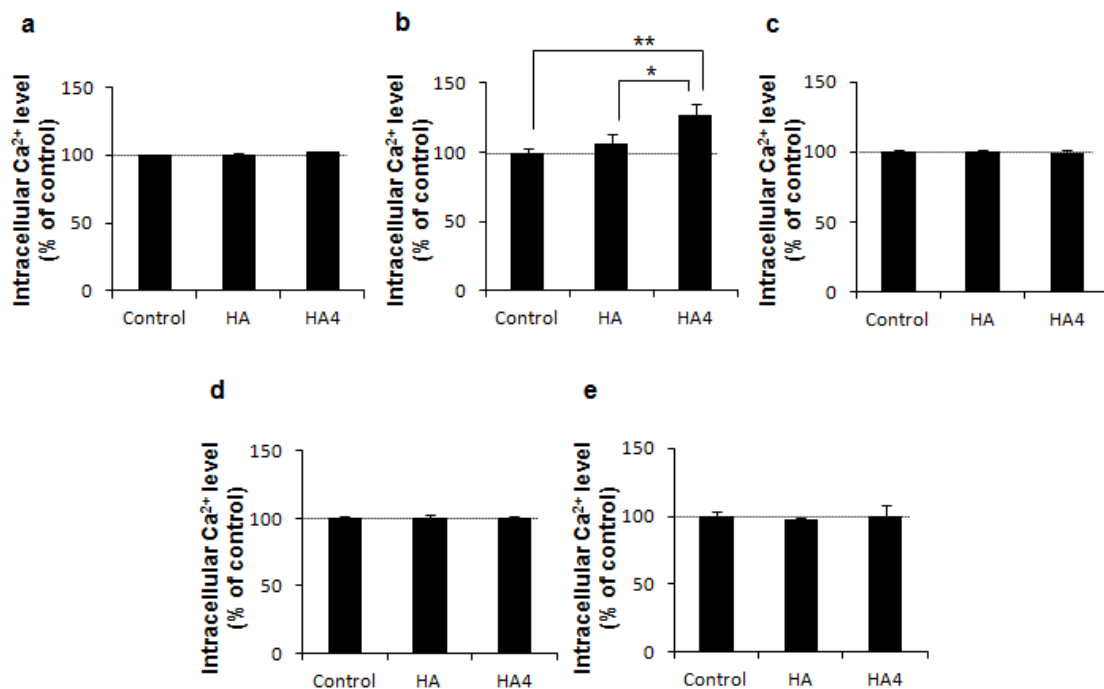


Fig. 29. Effect of HA and HA4 on the intracellular calcium level in keratinocytes. Intracellular calcium level was determined by make an indirect measurement of calcium complex. Keratinocytes were treated with 1 $\mu\text{g/mL}$ HA and HA4 for 1 h (a), 4 h (b), 6 h (c), 8 h (d) and 12 h (e). Values were compared with untreated controls. Values were the mean \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Tukey's *post-hoc* multiple comparison test.

第4節 考察

第1章にて、HA4は受動拡散で皮膚を透過し、ヘアレスマウス皮膚に塗布することでUVA照射による皮膚機能を改善することを明らかにした。この皮膚改善プロセスを解明するために、表皮細胞におけるHA4の表皮細胞分化に及ぼす影響について調査した。その結果、HA4は表皮細胞分化を増強することが示された。

インボルクリンやフィラグリンは後期分化マーカーであり、特に顆粒層に発現している⁸³⁾。インボルクリンの遺伝子発現やタンパク質レベルは、表皮細胞分化を調節する因子やカルシウム、ハイドロコルチゾン、レチノイン酸、ビタミンDといった様々な物質によって調節されることが知られている⁸⁴⁻⁸⁶⁾。また、ヒアルロン酸によって表皮細胞分化が誘導されることが報告されている⁷⁷⁾。本研究で、添加216時間(9日)後で、HA、HA4共に後期分化マーカーのインボルクリンおよびプロフィラグリン、トランスグルタミナーゼ遺伝子発現量が増加し(Fig. 24)、インボルクリンおよびフィラグリンタンパク質量が増加した(Fig. 26)。また、HA4は添加72時間(3日)後でK10タンパク質量が増加していたことから、HAと比べて表皮細胞分化を速く誘導することが示された(Fig. 25)。このことから、HA4はHAと同じく表皮細胞分化を誘導し、さらに、早い時期から分化を誘導することが示唆された。HAおよびHA4添加による細胞増殖評価において、48時間後に細胞数が減少した(Fig. 22b)。細胞の増殖と分化は逆相関の関係にあり、ハイドロコルチゾンは表皮ヒアルロン酸の減少に伴い表皮細胞の増殖を抑制し、分化を増強させることが報告されている⁸⁷⁾。このことから、HAおよびHA4添加により細胞増殖が抑えられていたのは、分化に働いていた可能性が考えられる。

次に、HA4による分化誘導メカニズムについて調査した。表皮細胞膜上の主

要なヒアルロン酸受容体は CD44 である。ヒアルロン酸と CD44 の相互作用により、細胞接着や細胞遊走、細胞増殖、形態形成の修復、創傷治癒を抑制する細胞内シグナルカスケードが誘発される^{88-91, 78, 92, 93})。また、ヒアルロン酸は CD44 との相互作用により、正常角層構造や表皮バリア機能に必須である表皮細胞の分化やコレステロール合成、ラメラ形成に関与することが報告されている^{77, 78})。そこで、HA4 も HA と同様、CD44 を介して表皮細胞分化を誘導していると予想し、検討を行った。表皮細胞に HA4 を添加することで、CD44 遺伝子発現量は 8 時間で 1.2 倍、24 時間で 1.5 倍、216 時間 (9 日) で 1.6 倍増加した (Fig. 27)。また、HA および HA4 の添加 8 時間で、CD44 およびリン酸化 CD44 タンパク質量は増加し、CD44 は各々 1.2、1.5 倍、リン酸化 CD44 は各々 1.7、6.5 倍増加した (Fig. 28)。表皮細胞の CD44 に結合するヒアルロン酸の最小単位は 10 糖であると報告がある⁹⁴)。このことから、HA4 によるリン酸化 CD44 タンパク質量増加は、HA4 が直接 CD44 に結合したことによるリン酸化なのか、異なる受容体またはタンパク質などに結合したことで CD44 が間接的にリン酸化されたのか、何らかのタンパク質などに結合した後に CD44 へ結合したことによるリン酸化なのかなど、詳細は不明であるが、いずれにせよ HA4 添加により CD44 はリン酸化されることが示された。また、CD44 およびリン酸化 CD44 タンパク質量は 8 時間で増加したにも関わらず、CD44 遺伝子発現は 8 時間以降にもさらに増加している。このことから、HA4 添加による CD44 遺伝子発現量とリン酸化 CD44 タンパク質の増加は直接的には関与しておらず、リン酸化 CD44 タンパク質量増加に伴い分化が促進し、遅れて増加した CD44 遺伝子発現は二次的な作用に関与するかもしれない。

ヒアルロン酸と CD44 の相互作用は PKN γ キナーゼ活性依存的 Rac1 が PLC γ 1 リン酸化やコルタクチンのリン酸化に働き、表皮細胞の機能である細胞

接着や分化に必須な PLC γ 1 介在 IP3 産生/ Ca^{2+} シグナリングや、コルタクチン介在につながる⁷⁸⁾。本研究で HA4 添加によりリン酸化 CD44 タンパク質量が増加していたことから、次に細胞内カルシウム濃度を測定した。その結果、HA および HA4 添加により細胞内カルシウム濃度は増加し、さらに HA4 では HA と比べて有意に増加した (Fig. 29)。HA4 添加によりリン酸化 CD44 タンパク質量および細胞内カルシウム濃度が増加したことから、HA4 は細胞接着や分化に関与することが考えられる。これらより、HA4 は直接的または間接的に CD44 のリン酸化を介して、表皮細胞分化を誘導することが示された。

第 3 章より、HA4 は HA と同様に表皮細胞分化を誘導し、その誘導は HA と比べて早いことが示された。また、HA4 による表皮細胞分化の誘導は直接的または間接的に CD44 がリン酸化され、様々なシグナルが働き、細胞内カルシウム濃度が上昇したことによる作用であることが示唆された。第 1 章において、HA4 は UVA 照射後の皮膚機能改善に効果があることが示されており、この改善効果は HA4 により表皮細胞分化が誘導されたことが要因の一つかもしれない。また、フィラグリンの遺伝子発現量に対してタンパク質量の増加が小さかったことは、フィラグリンが分解されて NMF が生成されている可能性が考えられる。そこで、フィラグリンの分解に働くブレオマイシン水解酵素の発現を調べた。その結果、表皮細胞に HA4 を添加することでブレオマイシン水解酵素遺伝子発現量が増加することが明らかとなった。このことから、HA4 は表皮細胞分化を誘導し、さらに NMF の生成にも関与することが示唆された。

結論

ヒアルロン酸は、皮膚の乾燥を防ぎ潤いのある肌を保つ目的で配合され、化粧品などとして美容分野で幅広く用いられている。また、極めて高い保水能力や粘弾性を示すため、化粧品以外でも、変形性関節症や関節リウマチ、眼科領域療法などの治療において大変重要な役割を担っている。ヒアルロン酸は GlcA と GlcNA の二糖を構成単位とするグリコサミノグリカンの一種で、非常に単純な構造にも関わらず、細胞空間や浸透圧の維持、水およびイオン、栄養素などの保持・移動、皮膚の水分保持や弾力性の維持といった多様な生理的・物理的特徴を持つ。これは、ヒアルロン酸の分子量（糖鎖長）に大きく関係している。近年では、ヒアルロン酸の中でも分子量の小さいヒアルロン酸オリゴ糖が注目されており、様々な分野で研究が行われている。高分子および低分子ヒアルロン酸は幅広い分子量分布での作用が報告されている一方で、ヒアルロン酸オリゴ糖はその分子量（糖鎖長）特異的で、高分子および低分子ヒアルロン酸にはない作用が多く報告されている。

ヒアルロン酸は水溶性の高分子ムコ多糖であるため、経皮適用では皮膚内への送達は困難である。そのため、現在、美容や医療の分野では、加齢によるシワやライン、瘢痕、その他の外傷性または生まれつきの傷痕など、皮膚の外見を改善する目的でヒアルロン酸注入療法が盛んに行われている。ヒアルロン酸の注入部位周辺では、コラーゲン生成が増加することも報告されている⁹⁵⁾。医療分野では、変形性膝関節症や五十肩などの治療に関節内ヒアルロン酸注入が行われており、疼痛改善に有用である。また、声門閉鎖不全に対して、声帯内へのヒアルロン酸注入も行われている。

長年研究され続けているヒアルロン酸は、近年、様々な疾患等に使用可能な

多糖体の医薬品を目指した開発が進められている。しかしヒアルロン酸オリゴ糖の機能については作用や結合部位など、いまだ未解明なことが多い。そこで本研究では、ヒアルロン酸の最小単位である HA4 に注目し、皮膚透過性の検討および皮膚における機能解析を行った。

第 1 章では、HA4 の皮膚透過性と皮膚機能に及ぼす影響として、HA4 の皮膚透過の基礎的検討を行い、さらにヘアレスマウスに HA4 を皮膚適用することによる角層水分量および TEWL、粘弾性への影響を検討した。その結果、HA4 は受動拡散で皮膚を濃度依存的に透過することが明らかとなった⁹⁶⁾。また、HA4 の皮膚透過は、pH 分配仮説に従うことが示された。さらに、HA4 を UVA 照射ヘアレスマウス皮膚に塗布することで、UVA 照射により悪化した角層水分量および TEWL、粘弾性 (R0) が改善し、さらに、ノーマル群と近い皮膚形態が観察された⁹⁶⁾。このことから、HA4 は UVA 照射による皮膚損傷の改善に関与することが示された。また、正常なヘアレスマウス皮膚でも、HA4 を塗布することでノーマルと比べて角層水分量が増加した。本研究より、HA4 は皮膚を透過することが *in vitro* 皮膚透過試験により明らかになり、*in vivo* での皮膚適用で皮膚機能に影響を及ぼしたことから、HA4 は非侵襲的に皮膚内へ送達することができ、さらに皮膚内における生物学的作用を示すことが想定された。加えて、皮膚を透過したことから、HA4 は真皮にも作用していることが予想され、線維芽細胞におけるヒアルロン酸生成に影響を与えている可能性が考えられた。また、角層水分量や TEWL が改善したことから、表皮細胞への影響として表皮細胞分化やセラミド生成、NMF 生成の関与が予想された。これらの考察より、第 2 章および第 3 章では、*in vitro* および、または *in vivo* による検討を行った。

第 2 章では、HA4 による線維芽細胞のヒアルロン酸生成に及ぼす影響として、線維芽細胞の単層培養および線維芽細胞と表皮細胞の共培養における線維芽細

胞での HAS 遺伝子発現、および *in vivo* 動物実験での HA4 の皮膚適用における皮膚内ヒアルロン酸量の変化を検討した。その結果、HA および HA4 添加により HAS1 遺伝子発現量が増加し、線維芽細胞の単層培養と比べて表皮細胞との共培養で HAS1 遺伝子発現量がさらに増加した⁹⁷⁾。しかし、それに伴うヒアルロン酸生成量に変化はみられなかった。一方、UVA 照射ヘアレスマウス皮膚に HA4 を塗布することで、皮膚内ヒアルロン酸量の増加が認められた。また、著者はすでに、線維芽細胞に HA4 を添加することでビタミン C 誘導体存在下で I 型コラーゲン (COL1A1) 遺伝子発現量が増加することを報告している⁹⁷⁾。これらのことから、HA4 を塗布することで非侵襲的に皮膚内ヒアルロン酸量を増加させることができ、さらにコラーゲン生成にも影響することが示唆された。しかし、*in vitro* 細胞実験においてヒアルロン酸生成量に変化はなかったが、*in vivo* 動物実験でヒアルロン酸量が増加していた詳細なメカニズムは不明であるため、今後、HA4 による皮膚内ヒアルロン酸量の増加メカニズムの解明を期待する。

第 3 章では、HA4 による表皮細胞の分化に及ぼす影響として、HA4 添加による分化マーカー発現、およびメカニズムとしてリン酸化 CD44 との関係を調べた。その結果、HA4 は HA と同様に表皮細胞分化を誘導し、さらに、HA4 は HA と比べて分化マーカーが早くに発現することが明らかとなった。また、HA4 による分化誘導メカニズムは、直接的または間接的に CD44 がリン酸化されたことで様々なシグナルが働き、最終的に細胞内カルシウム濃度が上昇したことによる作用であることが示唆された⁹⁸⁾。第 1 章において、UVA 照射ヘアレスマウス皮膚に HA4 を塗布することで、UVA 照射により悪化した TEWL および角層水分量が改善した。これは、表皮細胞分化の誘導により、障害された角質細胞が排泄されてバリア機能が正常に近づいたことで TEWL が回復し、セラミドなど

の角層間脂質が生成されたことで角層水分量が回復したことが考えられた。

以上の結果より、HA4 が線維芽細胞および表皮細胞に及ぼす影響は、HA と類似していることが示された。ヒアルロン酸は皮膚を透過しないとされているため、美容や医療の分野でヒアルロン酸注入療法が盛んに行われている。本研究で、ヒアルロン酸の最小単位である HA4 は、受動拡散で皮膚を透過すること、皮膚内でのヒアルロン酸生成や表皮細胞分化に影響を与えることが明らかとなった。これら本研究で見出した結果より、HA4 は非侵襲的に皮膚内へ送達できることから、日々のスキンケアやヒアルロン酸注入療法の代替法に応用できることが示唆された。今後、HA4 のさらなる生理作用が解明され、美容や医療での応用を期待する。

謝辞

本研究に際して終始懇切な御指導、御鞭撻を承りました城西大学皮膚生理学講座教授 橋本フミ恵 先生に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行に当たり、多大なる有益な御指導、御助言を承りました城西大学皮膚生理学講座准教授 徳留嘉寛 先生に深く感謝の意を表します。さらに、お忙しいなか御指導いただきました城西大学皮膚生理学講座助手 大川原正喜 先生に深く感謝いたします。

本研究に使用したヒアルロン酸の供与、およびそれに関する情報を御教授していただいた資生堂リサーチセンター 針谷毅 博士、松永由紀子 氏、森雄一郎 氏に感謝いたします。

本学位論文の作成に際し、御教示を承りました城西大学薬粧品動態制御学講座教授 杉林堅次 先生、ならびに機能性食品化学講座教授 和田政裕 先生に心より感謝いたします。

最後に、利益な御意見ならびに研究に御協力いただいた城西大学皮膚生理学講座の皆様にお礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Meyer K., Palmer J.W. The polysaccharide of the vitreous human. *J. Biol. Chem.*, **107**, 629-634 (1934)
- 2) Laurent T.C., Fraser J.R. Hyaluronan. *FASEB J.*, **6**, 2397-2404 (1992)
- 3) Hodge-Dufour J., Noble P.W., Horton M.R., Bao C., Wysoka M., Burdick M.D., Strieter R.M., Trinchieri G., Pure E. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J. Immunology*, **159**, 2492-2500 (1997)
- 4) McKee C.M., Penno M.B., Cowman M., Burdick M.D., Strieter R.M., Bao C., Noble P.W. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J. Clin. Invest.*, **98**, 2403-2413 (1996)
- 5) Noble P.W., McKee C.M., Cowman M., Shin H.S. Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages. *J. Exp. Med.*, **183**, 2373-2378 (1996)
- 6) West D.C., Hampson I.N., Arnold F., Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*, **228**, 1324-1326 (1985)
- 7) Feinberg R.N., Beebe D.C., Hyaluronate in vasculogenesis. *Science*, **220**, 1177-1179 (1983)
- 8) Nakamura K., Yokohama S., Yoneda M., Okamoto S., Tamaki Y., Ito T., Okada M., Aso K., Makino I. High, but not low, molecular weight hyaluronan prevents T-cell-mediated liver injury by reducing proinflammatory cytokines in mice. *J. Gastroenterol.*, **39**, 346-354 (2004)

- 9) Spessotto P., Rossi F.M., Degan M., Di Francia, R., Perris R., Colombatti A., Gattei V. Hyaluronan-CD44 interaction hampers migration of osteoclast-like cells by down-regulating MMP-9. *J. Cell. Biol.*, **158**, 1133-44 (2002)
- 10) Takahashi K., Goomer R.S., Harwood F., Kubo T., Hirasawa Y., Amiel D. The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1 β (IL-1 β), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, **7**, 182-90 (1999)
- 11) Neumann A., Schinzel R., Palm D., Riederer P., Munch G. High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF-kappaB activation and cytokine expression. *FEBS Lett.*, **453**, 283-287 (1999)
- 12) Feinberg R.N., Beebe D.C. Hyaluronate in vasculogenesis. *Science*, **220**, 1177-1179 (1983)
- 13) Hascall V.C., Heinegard D. Aggregation of cartilage proteoglycans. II. Oligosaccharide competitors of the proteoglycan-hyaluronic acid interaction. *J. Biol. Chem.*, **249**, 4242-4249 (1974)
- 14) Underhill C.B., Toole B.P. Physical characteristics of hyaluronate binding to the surface of simian virus 40-transformed 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4544-4549 (1980)
- 15) Hardwick C., Hoare K., Owens R., Hohn H.P., Hook M., Moore D., Cripps V., Austen L., Nance D.M., Turley E.A. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J. Cell Biol.*, **117**,

- 1343-1350 (1992)
- 16) Zhou B., Weigel J.A., Fauss L., Weigel P.H. Identification of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE). *J. Biol. Chem.*, **275**, 37733-37741 (2000)
 - 17) Zeng C., Toole B.P., Kinney S.D., Kuo J.W., Stamenkovic I. Inhibition of tumor growth *in vivo* by hyaluronan oligomers. *Int. J. Cancer.*, **77**, 396-401 (1998)
 - 18) Ghatak S., Misra S., Toole B.P. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.*, **277**, 38013-38020 (2002)
 - 19) Tammi, R., Pasonen-Seppänen, S., Kolehmainen, E., Tammi, M. Hyaluronan synthase induction and hyaluronan accumulation in mouse epidermis following skin injury. *J. Invest. Dermatol.*, **124**, 898-905 (2005)
 - 20) Rilla, K., Pasonen-Seppänen, S., Rieppo, J., Tammi, M., Tammi, R. The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth factor. *J. Invest. Dermatol.*, **123**, 708-714 (2004)
 - 21) Gebhardt, G., Averbek, M., Diedenhofen, N., Willenberg, A., Anderegg, U., Sleeman, J.P., Simon, J.C. Dermal hyaluronan is rapidly reduced by topical treatment with glucocorticoids. *J. Invest. Dermatol.*, **130**, 141-149 (2010)
 - 22) Bourguignon, L. Y.W., Ramez, M., Gilad, E., Singleton, P.A., Mao-Qiang Man, Crumrine, D.A., Elias, P.M., Feingold, K.R. Hyaluronan-CD44

- interaction stimulates keratinocyte differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1356-1365 (2006)
- 23) Campo, G.M., Avenoso, A., Campo, S., D'Ascola, A., Nastasi, G., Calatroni, A. Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes, *Biochemical Pharmacology*, **80**, 480-490 (2010)
- 24) Jan D.B., Marcus M.H.M.M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.*, **9**, 165-169 (2000)
- 25) Billich A., Aschauner H., Aszodi A., Stuetz A. Percutaneous absorption of drugs used in atopic eczema: pimecrolimus permeates less through skin than corticosteroids and tacrolimus. *Int. J. Pharm.*, **269**, 29-35 (2004)
- 26) Haratake A., Uchida Y., Schmuth M., Tanno O., Yasuda R., Epstein J.H., Elias M., Holleran W.M. UVB-induced alterations in permeability barrier function: roles for epidermal hyperproliferation and thymocyte-mediated response. *J. Invest. Dermatol.*, **108**, 769-775 (1997)
- 27) Wu X-M., Todo H., Sugibayashi K. Effect of pretreatment of needle puncture and sandpaper abrasion on the *in vitro* skin permeation of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran. *Int. J. Pharm.*, **316**, 102-108 (2006)
- 28) Leveque N., Makki S., Hadgraft J., Humbert Ph. Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. *Int. J. Pharm.*, **269**, 323-328 (2004)

- 29) Lapcik L., Lapcik L.L., De Smedt S., Demeester J., Chabrechek P.
Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. *Chem. Rev.*, **98**, 2663-2684 (1998)
- 30) Zhang J., Senger B., Vautier D., Picart C., Schaaf P., Voegel J.C., Lavalle P.
Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid. *Biomaterials*, **26**, 3353-3361 (2005)
- 31) Tsukahara K., Moriwaki S., Hotta M., Fujimura T., Sugiyama-Nakagiri Y., Sugawara S., Kitahara T., Takema Y.
The effect of sunscreen on skin elastase activity induced by ultraviolet-A irradiation. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 2302-2307 (2005)
- 32) Bissett D.L., Hannon D.P., Orr T.V.
An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 367-378 (1987)
- 33) Chen W.Y., Abatangelo G.
Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen.*, **7**, 79-89 (1999)
- 34) Oestmann E., Lavrijsen A., Hermans J., Ponc M.
Skin barrier function in healthy volunteers as assessed by transepidermal water loss and vascular response to hexyl nicotinate: intra- and inter-individual variability. *Br. J. Dermatol.*, **128**, 130-136 (1993)
- 35) Bissett D.L., Hannon D.P., Orr T.V.
An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 367-378 (1987)
- 36) Bourguignon L.Y.W., Ramez M., Gilad E., Singleton A., Man M-Q., Crumrine D.A., Elias P.M., Feingold K.R.
Hyaluronan-CD44 interaction

- stimulates keratinocyte differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1356-65 (2006)
- 37) Larnier C. Kerneur C. Robert L. Moczar M. Effect of testicular hyaluronidase on hyaluronate synthesis by human skin fibroblasts in culture. *Biochim. Biophys. Acta*, **1014**, 145-152 (1989)
- 38) Mian N. Characterization of a high-Mr plasma-membrane-bound protein and assessment of its role as a constituent of hyaluronate synthase complex. *Biochem. J.*, **237**, 343-357 (1986)
- 39) Itano N., Kimata, K. Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 9875-9878 (1996)
- 40) Watanabe K., Yamaguti Y. Molecular identification of a putative human hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 22945-22948 (1996)
- 41) Shyjan A.M., Heldin P., Butcher E.C., Yoshino T., Briskin M.J. Functional cloning of the cDNA for a human hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 23395-23399 (1996)
- 42) Spicer A.P., Augustine M.L., McDonald J.A. Molecular cloning and characterization of a putative mouse hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 23400-23406 (1996)
- 43) Spicer A.P., Olson J.S., McDonald J.A. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the third putative mammalian hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 8957-8961 (1997)
- 44) Hoshi H., Nakagawa H., Nishiguchi S., Iwata K., Niikura K., Monde K.,

- Nishimura S. An engineered hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.*, **279**, 2341-2349 (2004)
- 45) Yoshida M., Itano N., Yamada Y., Kimura K. *In vitro* synthesis of hyaluronan by a single protein derived from mouse HAS1 gene and characterization of amino acid residues essential for the activity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 497-506 (2000)
- 46) Itano N., Sawai T., Yoshida M., Lenas P., Yamada Y., Imagawa M., Shinomura T., Hamaguchi M., Yoshida Y., Ohnuki Y., Miyauchi S., Spicer A.P., McDonald J.A., Kimata K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J. Biol. Chem.*, **274**, 25085-25092 (1999)
- 47) Tomida M., Koyama H., Ono T. Hyaluronic acid synthetase in cultured mammalian cells producing hyaluronic acid oscillatory change during the growth phase and suppression by 5-bromodeoxyuridine. *Biochem. Biophys. Acta*, **338**, 352-363 (1974)
- 48) Brecht M., Mayer U., Schlosser E., Prehm P. Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis. *Biochem. J.*, **239**, 445-450 (1986)
- 49) Yoneda M., Yamagata M., Suzuki S., Kimata K. Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture. *J. Cell Sci.*, **90**, 265-273 (1988)
- 50) Matuoka K., Namda M., Mitsui Y. Hyaluronate synthetase inhibition by normal and transformed human fibroblasts during growth reduction. *J. Cell Biol.*, **104**, 1105-1115 (1987)

- 51) Kitchen J.R., Cysyk R.L. Synthesis and release of hyaluronic acid by swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem. J.*, **309**, 649-656 (1995)
- 52) Spicer A.P., Nguyen T.K. Mammalian hyaluronan synthases: investigation of functional relationships *in vivo*. *Biochem. Soc. Trans.*, **27**, 109-115 (1999).
- 53) Spicer A.P., McDonald J.A. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1923-1932 (1998)
- 54) Sayo T., Sugiyama Y., Takahashi Y., Ozawa N., Sakai S., Ishikawa O., Tamura M., Inoue S. Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultures of human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 43-48 (2002).
- 55) Sayo T., Sakai S., Inoue S. Synergistic effect of *N*-acetylglucosamine and retinoids on hyaluronan production in human keratinocytes. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **17**, 77-83 (2004).
- 56) Campo G.M., Avenoso A., Campo S., D'Ascola A., Ferlazzo M., Calatroni A. Differential effect of growth factors on hyaluronan synthase gene expression in fibroblast exposed to oxidative stress. *J. Biochem.*, **72**, 974-982 (2007)
- 57) Wang H.S., Tung W.H., Tang K.T., Wong Y.K., Huang G.J., Wu J.C., Guo Y.J., Chen C.C. TGF- β induced hyaluronan synthesis in orbital fibroblasts involves protein kinase C β II activation *in vitro*. *J. Cell. Biochem.*, **95**, 256-267 (2005)
- 58) Saavalainen K., Pasonen-Seppanen S., Dunlop T.W., Tammi R., Tammi

- M.I., Carlberg C. The human hyaluronan synthase 2 gene is a primary retinoic acid and epidermal growth factor responding gene. *J. Biol. Chem.*, **280**, 14636-14644 (2005)
- 59) Pienimäki J.P., Rilla K., Fulop C., Sironen R.K., Karvinen S., Pasonen S., Lammi M.J., Tammi R., Hascall V.C., Tammi M.I. Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan. *J. Biol. Chem.*, **276**, 20428-20435 (2001)
- 60) Karvinen S., Pasonen-Seppänen S., Hyttinen J.M., Pienimäki J.P., Torronen K., Jokela T.A., Tammi M.I., Tammi R. Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3. *J. Biol. Chem.*, **278**, 49495-49504 (2003)
- 61) Pasonen-Seppänen S., Karvinen S., Torronen K., Hyttinen J.M., Jokela T., Lammi M.J., Tammi M.I., Tammi R. EGF upregulates, whereas TGF- β downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation. *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 1083-1044 (2003)
- 62) Jacobson A., Briskin M.J., Spicer A.P., Heldin P. Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli. *Biochem. J.*, **348**, 29-35 (2000)
- 63) Blanpain C., Lowry W.E., Pasolli H.A., Fuchs E. Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage.

- Genes Dev.*, **20**, 3022-3035 (2006)
- 64) Segre J.A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J. Clin. Invest.*, **116**, 1150-1158 (2006)
- 65) Fleckman F., Dale B.A., Holbrook K.A., Profilaggrin, a high-molecular-weight precursor of filaggrin in human epidermis and cultures keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **85**, 507-512 (1985)
- 66) Scott I. R., Harding C.R., Barrett J.G. Histidine-rich protein of the keratohyalin granules: source of the free amino acid, urocanic acid and pyrrolidone carboxylic acid in the atratum ccorneum. *J. Biochem. Biophys. Acta*, **719**, 110-117 (1982)
- 67) Kamata Y., Taniguchi A., Yamamoto M., Nomura J., Ishihara K., Takahara H., Hibino T., Takeda A. Neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for the breakdown of deiminated filaggrin into amino acids. *J. Biol. Chem.*, **284**, 12829-12836 (2009)
- 68) Eckert R.L., Yaffe M.B., Crish J.F., Murthy S., Rorke E.A., Welter J.F. Involucrin - structure and role in envelope assembly. *J. Invest. Dermatol.*, **100**, 613-617 (1993)
- 69) Rice R.H., Green H. The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked protein. *Cell*, **11**, 417-422 (1977)
- 70) Eckert R.L., Green H. Structure and evolution of the human involucrin gene. *Cell*, **46**, 583-589 (1986)
- 71) Simon M., Green H. The glutamine residues reactive in transglutaminase-catalyzed cross-linking of involucrin. *J. Biol. Chem.*,

263, 18093-18098 (1988)

- 72) Yaffe M.B., Murthy S., Eckert R.L. Evidence that involucrin is a covalently linked constituent of highly purified cultured keratinocyte cornified envelopes. *J. Invest. Dermatol.*, **100**, 3-9 (1993)
- 73) Lorand L., Graham R.M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 140-156 (2003)
- 74) Griffin M., Casadio R., Bergamini C.M. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem. J.*, **368**, 377-396 (2002)
- 75) Bajorath J. Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. *Proteins.*, **39**, 103-111 (2000)
- 76) Aruffo A., Stamenkovic I., Melnick M., Underhill C.B., Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronan. *Cell*, **61**, 1303-1313 (1990)
- 77) Bourguignon L.Y.W., Ramez M., Gilad E., Singleton A., Man M-Q., Crumrine D.A., Elias P.M., Feingold K.R. Hyaluronan-CD44 interaction stimulates keratinocyte differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1356-1365 (2006)
- 78) Bourguignon L.Y.W., Singleton P.A., Diedrich F. Hyaluronan-CD44 interaction with Rac1-dependent PKN- γ kinase promotes PLC γ 1 activation, Ca²⁺ signaling and cortactin-cytoskeleton function leading to keratinocyte adhesion and differentiation. *J. Biol. Chem.*, **279**, 29654-29669 (2004)

- 79) Neame S.J., Isacke C.M. Phosphorylation of CD44 *in vivo* requires both Ser323 and Ser325, but does not regulate membranes localization or cytoskeletal interaction in epithelial cells. *EMBO. J.*, **11**, 4733-4738 (1992)
- 80) Peck D., Isacke C.M. Hyaluronan-dependent cell migration can be blocked by a CD44 cytoplasmic domain peptide containing a phosphoserine at position 325. *J. Cell Sci.*, **111**, 1595-1601 (1998)
- 81) Pure E., Camp R.L., Peritt D., Panettieri R.A., Jr Lazaar A.L., Nayak S. Defective phosphorylation and hyaluronate binding of CD44 with point mutations in the cytoplasmic domain. *J. Exp. Med.*, **181**, 55-62 (1995)
- 82) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 83) Rice R.H., Green H. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell*, **18**, 681-694 (1979)
- 84) Younus S.H., Gilchrest B.A. Modulation of mRNA levels during human keratinocyte differentiation. *J. Cell Physiol.*, **152**, 232-239 (1992)
- 85) Cline P.R., Rice R.H. Modulation of involucrin and envelope competence in human keratinocytes by hydrocortisone retinyl acetate, and growth arrest. *Cancer Res.*, **43**, 3203-3207 (1983)
- 86) Su M.J., Bikle D.D., Mancianti M.L., Pillai S. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ potentiates the keratinocytes response to calcium. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14723-14729 (1994)

- 87) Agren U.M., Tammi M., Tammi R. Hydrocortisone regulation of hyaluronan metabolism in human skin organ culture. *J. Cell Physiol.*, **164**, 240-48 (1995)
- 88) Lokeshwar V.B., Iida N., Bourguignon L.Y.W. The cell adhesion molecule, GP116, is a new CD44 variant (ex14/v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, **271**, 23853-23864 (1996)
- 89) Singleton P.A., Bourguignon L.Y.W. CD44v10 interaction with Rho-kinase (ROK) activates inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) receptor-mediated Ca²⁺ signaling during hyaluronan (HA)-induced endothelial cell migration. *Cell Mot. Cytos.*, **53**, 293-316 (2002)
- 90) Singleton P.A., Bourguignon L.Y.W. CD44 interaction with ankyrin and IP₃ receptors in lipid rafts promotes hyaluronan-mediated Ca²⁺ signaling leading to nitric oxide production and endothelial cell adhesion and proliferation. *Exp. Cell Res.*, **295**, 102-118 (2004)
- 91) Turley E.A., Nobel P.W., Bourguignon L.Y.W. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J. Biol. Chem.*, **277**, 4589-4592 (2002)
- 92) Toole B.P. Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation. In: Hay ED, ed. *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2nd edn. New York: Plenum Press., 305-341 (1991)
- 93) Alaish S.M., Yager D., Diegelmann R.F., Cohen I.K. Biology of fetal wound healing: hyaluronate receptor expression in fetal fibroblast. *J. Pediatr. Surg.*, **29**, 1040-1043 (1994)
- 94) Tammi R., MacCallum D., Hascall V.C., Pienimäki J-P., Hyttinen M.,

- Tammi M. Hyaluronan bound to CD44 on keratinocytes is displaced by hyaluronan decasaccharides and not hexasaccharides. *J. Biol. Chem.*, **273**, 28878-28888 (1998)
- 95) Wang F., Garza L.A., Kang S., Varani J., Orringer J.S., Fisher G.J., Voorhees J.J. *In vivo* stimulation of *de novo* collagen production caused by cross-linked hyaluronic acid dermal filler injections in photodamaged human skin. *Arch. Dermatol.*, **143**, 155-163, (2007)
- 96) Kage M., Tokudome Y., Hashimoto F. Permeation of hyaluronan tetrasaccharides through hairless mouse skin: an *in vitro* and *in vivo* study. *Arch. Dermatol. Res.*, **305**, 69-77 (2013)
- 97) Kage M., Tokudome Y., Matsunaga Y., Hariya T., Hashimoto F. Expression of hyaluronan synthase and collagen type I mRNA by hyaluronan tetrasaccharides in normal human dermal fibroblasts. *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, **35**, 1-5 (2013)
- 98) Kage M., Tokudome Y., Matsunaga Y., Hariya T., Hashimoto F. Effect of hyaluronan tetrasaccharides on epidermal differentiation and CD44 phosphorylation in normal human epidermal keratinocytes. 2012 submitted